

Departamento de Microbiología

Facultad de Biología



**Regulación de la producción del Exopolisacárido en
Sinorhizobium fredii HH103, un simbiote de la soja
y otras leguminosas**

Sebastián Acosta Jurado

Sevilla, 2017

Departamento de Microbiología

Facultad de Biología



**Regulación de la producción del Exopolisacárido en
Sinorhizobium fredii HH103, un simbiote de la soja
y otras leguminosas**

Memoria presentada por el licenciado en Biología Sebastián Acosta
Jurado para optar al grado de Doctor

Sevilla, 2017

Departamento de Microbiología

Facultad de Biología



LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Fdo. Dr. José Enrique Ruíz Sainz
Catedrático
Departamento de Microbiología
Universidad de Sevilla

Fdo. Dr. José María Vinardell González
Profesor Titular
Departamento de Microbiología
Universidad de Sevilla

Fdo. Sebastián Acosta Jurado



Mi agradecimiento al V Plan Propio de Investigación de la
Universidad de Sevilla por haber hecho posible la
realización de este trabajo

“Para mi, no hay emoción comparable a la que produce la actividad creadora, tanto en ciencia como en arte, literatura u otras ocupaciones del intelecto humano. Mi mensaje, dirigido sobre todo a la juventud, es que si sienten inclinación por la ciencia, la sigan, pues no dejará de proporcionarles satisfacciones inigualables. Ciertamente abundan los momentos de desaliento y frustración, pero estos se olvidan pronto, mientras que las satisfacciones no se olvidan jamás.”

Ramón y Cajal

A mi familia y mis tesoros

Agradecimientos

Mi agradecimiento a la Universidad de Sevilla por permitirme realizar esta tesis doctoral. Agradecer a todos los miembros del departamento, a mis directores de tesis y sobre todo a mi familia y mujer por los ánimos y por el apoyo durante todos estos años.

INDICES

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. Los rizobios	1
2. La soja y su importancia en la sociedad.	2
3. Rizobios capaces de nodular soja	3
4. Establecimiento del proceso simbiótico.....	5
5. Sistemas de Secreción	10
5.1. Sistema de Secreción de Tipo 3.....	10
6. <i>Fine-tuning</i> de la expresión de los genes <i>nod</i>	12
6.1. NodD.....	13
6.2. NodR	14
6.3. SyrM	16
7. Superficie rizobiana	17
7.1. Glucanos Cíclicos (GC)	19
7.2. Polisacárido capsular de tipo antígeno K (KPS).....	21
7.3. Lipopolisacárido (LPS)	23
7.4. Exopolisacárido (EPS)	27
OBJETIVOS	35
MATERIAL Y MÉTODOS	39
1. Material y Métodos relacionados con bacterias.	41
1.1. Bacterias, plásmidos y agentes selectivos e identificativos.	41
1.1.1. Bacterias y plásmidos.	41
1.1.2. Agentes selectivos e identificativos.....	46
1.1.3. Flavonoides.....	47
1.2. Medios de cultivo.....	47
1.2.1. Medios de cultivo para <i>Sinorhizobium</i>	47

1.2.2.	Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	50
1.2.3.	Solución de Conservación de bacterias	50
1.3.	Medidas de pH y espectrometría.	50
1.4.	Estudio de los polisacáridos superficiales de la bacteria <i>S. fredii</i> HH103.....	51
1.4.1.	Estudios de Resonancia Magnética Nuclear (H-RMN).	51
1.4.2.	Tinción con Rojo Congo y unión a Calcoflúor	51
1.4.3.	Estudio del lipopolisacárido (LPS).....	52
1.4.4.	Detección inmunológica de LPS	54
1.4.5.	Estudio del polisacárido capsular tipo antígeno K (KPS)	56
1.4.6.	Estudio del exopolisacárido (EPS).....	58
1.5.	Curvas de crecimiento	58
1.6.	Ensayos de osmotolerancia	59
1.7.	Ensayos de formación de biopelícula (<i>biofilm</i>).....	59
1.8.	Ensayos de auto-agregación	60
1.9.	Ensayos de movilidad.....	60
1.9.1.	Ensayos de movilidad en superficie	61
1.9.2.	Ensayos de movilidad de tipo <i>swimming</i>	61
1.10.	Métodos relacionados con ácidos nucleicos.....	62
1.10.1.	Métodos de transferencia de ADN	62
1.10.2.	Extracción del ADN genómico.....	63
1.10.3.	Extracción del ADN plasmídico	64
1.10.4.	Restricción del ADN.	65
1.10.5.	Electroforesis del ADN	66
1.10.6.	Aislamiento del ADN de geles de agarosa.	66
1.10.7.	Desfosforilación del ADN	66
1.10.8.	Ligación del ADN	67

1.10.9.	Amplificación del ADN por PCR	67
1.10.10.	RT-PCR.....	69
1.10.11.	Mutagénesis in vitro por delección mediante PCR solapante	70
1.10.12.	Transferencia por conjugación de pK18 <i>mobsac</i> y derivados	71
1.10.13.	Hibridación ADN:ADN	72
1.10.14.	Secuenciación del ADN	75
1.10.15.	Análisis informático de secuencias de ADN.....	75
1.10.16.	Cuantificación de la expresión de genes bacterianos	75
1.11.	Técnicas relacionadas con las proteínas	83
1.11.1.	Cuantificación de proteínas	83
1.11.2.	Electroforesis unidireccional de las proteínas	83
1.11.3.	Tinción de las proteínas con azul de Coomassie	84
1.11.4.	Inmunodetección de las proteínas.	84
1.11.5.	Ensayo de retardo en gel (EMSA)	86
2.	Material y métodos utilizados para los estudios con plantas	89
2.1.	Plantas.....	89
2.2.	Soluciones nutritivas para las plantas.....	90
2.3.	Desinfección y germinación de semillas	90
2.4.	Inoculación y cultivo de plantas.....	91
2.4.1.	Jarro de Leonard (Vincent, 1970)	91
2.4.2.	Sistema de hidroponía en vaso de precipitado o tubo	91
2.5.	Ensayos de nodulación.	92
2.5.1.	Recuento del número de nódulos y estimación de su masa.....	92
2.5.2.	Estimación de la actividad nitrogenasa	92
2.5.3.	Secado de la parte aérea de la planta	93
2.5.4.	Aislamientos de las bacterias de los nódulos.....	93

2.6. Visualización de primordios nodulares.....	93
2.7. Microscopía de Epifluorescencia	94
2.8. Microscopía confocal	94
RESULTADOS	95
Capítulo I. Caracterización de la región <i>rkp-2</i> *	97
1. Introducción.....	97
2. Resultados	98
2.1. Organización genética y análisis transcripcional de la región <i>rkp-2</i> de <i>S. fredii</i> HH103.	98
2.2. Los mutantes <i>lpsL</i> o <i>rkpK</i> de <i>S. fredii</i> HH103 están afectados en la producción del LPS, pero no del KPS	101
2.3. El gen <i>rkpK</i> de <i>S. fredii</i> HH103 está involucrado en la producción de EPS. ...	104
2.4. El mutante <i>rkpK</i> posee alterada la capacidad de formación de <i>biofilm</i> y auto-agregación	109
2.5. La inactivación de los genes de la región <i>rkp-2</i> disminuye la capacidad simbiótica de <i>S. fredii</i> HH103 con soja y <i>cowpea</i>	110
3. Discusión.....	117
Capítulo II. Estudio de la relevancia simbiótica de los polisacáridos superficiales de <i>S. fredii</i> HH103 con <i>L. japonicus</i> Gifu y <i>L. burttii</i> *	123
1. Introducción.....	123
2. Resultados	125
2.1. Mutantes en la producción de EPS	127
2.2. Mutantes afectados en EPS y LPS	127
2.3. Mutantes afectados en el KPS	127
2.4. Mutantes afectados en KPS y LPS.....	128
2.5. Mutantes afectados en KPS y EPS.....	129
2.6. Mutantes en LPS	129

2.7. Mutantes en GC	132
2.8. Análisis microscópicos de <i>L. burtii</i> inoculado con <i>S. fredii</i> HH103	135
2.9. El flagelo bacteriano no se requiere para la infección por <i>crack entry</i>	137
3. Discusión	139
Capítulo III. Regulación de la producción de EPS por flavonoides*	145
1. Introducción.....	145
2. Resultados	147
2.1. La producción de EPS en <i>S. fredii</i> HH103 está regulada por flavonoides inductores de genes <i>nod</i>	147
2.2. La regulación del EPS de <i>S. fredii</i> HH103 mediada por flavonoides depende del regulador <i>nodD1</i>	148
2.3. Los experimentos de H-RMN confirman que la genisteína disminuye la producción de EPS de <i>S. fredii</i> de forma dependiente de NodD1.	153
2.4. La genisteína promueve una reducción de la expresión de <i>exoK</i> y <i>exoY2</i> en cultivos de fase estacionaria de <i>S. fredii</i> HH103	155
3. Discusión.....	158
Capítulo IV. Caracterización de los genes <i>mucR1</i> y <i>mucR2</i> de <i>S. fredii</i> HH103*	163
1. Introducción.....	163
2. Resultados.....	165
2.1. <i>S. fredii</i> HH103 posee dos copias del gen <i>mucR</i>	165
2.2. Construcción de mutantes en los genes <i>mucR1</i> y <i>mucR2</i>	165
2.3. <i>S. fredii</i> HH103 MucR1 es un regulador positivo de la producción de EPS ...	166
2.4. La mutación en <i>mucR1</i> afecta a las capacidades de formación de <i>biofilm</i> y auto-agregación de <i>S. fredii</i> HH103	168
2.5. La mutación en el gen <i>mucR1</i> de <i>S. fredii</i> HH103 no afecta a la producción de LPS, KPS y GC del espacio periplásmico, pero aumenta la cantidad de GC extracelulares.	174

2.6.	La mutación en <i>mucR1</i> altera la tasa de crecimiento.....	177
2.7.	MucR1 es un factor importante para la simbiosis de <i>S. fredii</i> HH103 con <i>Glycine max</i> cultivar Williams y <i>Lotus burtii</i>	180
2.8.	MucR1 reprime su propia transcripción mediante la unión a su propio promotor	181
2.9.	MucR1 de <i>S. fredii</i> HH103 es un regulador global	184
2.9.1.	Genes dependientes de MucR1 en ausencia de genisteína.....	186
2.9.2.	La presencia de la genisteína incrementa el número de DEG en Δ <i>mucR1</i> de HH103	189
3.	Discusión.....	194
	DISCUSIÓN GENERAL	205
	CONCLUSIONES	217
	CONCLUSIONS	221
	RESÚMEN	223
	SUMMARY	235
	BIBLIOGRAFÍA	247
	ANEXOS	293
	Anexo I. Material Suplementario y <i>Datasets</i> :.....	295
1.	Material Suplementario Capítulo II.....	295
2.	Material Suplementario Capítulo IV.....	295
3.	<i>Datasets</i>	296
	Anexo II. Publicaciones de esta tesis	297
	Capítulo I:.....	297
	Capítulo II:.....	317
	Capítulo III:.....	333
	Capítulo IV:	351

Anexo III. Publicaciones durante el periodo predoctoral.....	367
--	-----

INDICE DE TABLAS

Figura 1. Árbol filogenético no enraizado de las secuencias de ADN ribosómico 16S de Alfa-, Beta- y Gammaproteobacterias seleccionadas	2
Figura 2. Estrategias de nodulación en los rizobios	7
Figura 3. Modelo de evolución de las vías de infección en leguminosas y proceso de desarrollo nodular a través de la vía dependiente de Factores Nod	9
Figura 4. Esquema de regulación de la secreción de Nops a través del T3SS en <i>S. fredii</i> HH103	12
Figura 5. Esquema de regulación de la expresión de los genes <i>nod</i> mediada por los principales reguladores en <i>S. fredii</i> HH103	13
Figura 6. Modelos de regulación de la expresión de los genes de nodulación por NodR	16
Figura 7. Esquema de la superficie rizobiana en la que se muestra la disposición de los polisacáridos superficiales.....	18
Figura 8. Estructura química de un glucano cíclico de <i>S. fredii</i> HH103	21
Figura 9. Estructura química de la unidad de repetición del KPS de <i>S. fredii</i> HH103	23
Figura 10. Representación esquemática de la estructura química del LPS de <i>S. meliloti</i>	25
Figura 11. Estructura química de los EPS producidos por diferentes especies de <i>Sinorhizobium</i> y <i>Bradyrhizobium</i>	29
Figura 12. Modelo de reconocimiento de rizobios compatibles mediante un proceso de dos pasos a través del receptor EPR3.....	33
Figura 13. Esquema de los diferentes cebadores empleados en RT-PCR	69
Figura 14. Esquema de la mutagénesis <i>in vitro</i> por delección mediante PCR solapante.	72
Figura 15. Sistema de hidroponía en vaso de precipitado.....	91
Figura 16. Los genes <i>lpsL</i> y <i>rkpK</i> no se con-transcriben en <i>S. fredii</i> HH103	100

Figura 17. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) e inmunodetección de LPS de extractos crudos de <i>S. fredii</i> HH103 y los mutantes en la región <i>rkp-2</i>	102
Figura 18. Los mutantes de la región <i>rkp-2</i> no están afectados en la producción del polisacárido capsular (KPS).....	103
Figura 19. Espectro de H-RMN (500 MHz, 353 K) de los polisacáridos aislados del medio de cultivo de <i>S. fredii</i> HH103	105
Figura 20. Mucosidad (en medio YMA) y capacidad de unión de calcofluor y rojo Congo (en medio TY) de <i>S. fredii</i> HH103 y diferentes mutantes afectados en la producción de polisacáridos superficiales.....	107
Figura 21. Osmotolerancia de <i>S. fredii</i> HH103 y los mutantes en la región <i>rkp-2</i>	108
Figura 22. Capacidad de auto-agregación y de formación de <i>biofilm</i> de <i>S. fredii</i> HH103 y los mutantes de la región <i>rkp-2</i>	110
Figura 23. Patrón de nodulación de <i>S. fredii</i> HH103 y su derivado <i>rkpK</i> en <i>cowpea</i> ...	112
Figura 24. Fenotipo simbiótico de <i>S. fredii</i> HH103, su derivado <i>lpsL</i> , y la estirpe complementada del mutante <i>lpsL</i> con soja y <i>cowpea</i>	113
Figura 25. Primordios nodulares en raíces de soja o <i>cowpea</i> inoculadas con <i>S. fredii</i> HH103 y varios derivados	113
Figura 26. Análisis de microscopía de epifluorescencia de raíces de <i>cowpea</i> y soja inoculadas con <i>S. fredii</i> HH103 y su derivado <i>lpsL</i>	114
Figura 27. Análisis de microscopía confocal de raíces de soja y <i>cowpea</i> inoculadas con <i>S. fredii</i> HH103 y su derivado <i>lpsL</i>	116
Figura 28. Estructura química de los polisacáridos superficiales y mapa de los genes mutados estudiados en el capítulo II	126
Figura 30. Cinéticas de nodulación de <i>L. burttii</i> inoculadas con <i>S. fredii</i> HH103 y diversos mutanes afectados en polisacáridos superficiales.....	131
Figura 31. Plantas y nódulos de <i>L. burttii</i> inóculadas con <i>S. fredii</i> HH103 y los diferentes mutantes afectados en los polisacáridos	135
Figura 32. Fenotipo simbiótico de <i>L. burttii</i> inoculado con <i>S. fredii</i> HH103 y <i>M. loti</i> MAFF303099.....	136

Figura 33. Número de tubos de infección en los pelos radicales de <i>L. japonicus</i> Gifu y <i>L. burttii</i> inoculados con <i>S. fredii</i> HH103 DsRed o <i>M. loti</i> MAFF303099 DsRed.....	137
Figura 34. Movilidad <i>swimming</i> de <i>S. fredii</i> HH103 y el mutante <i>flaCBAD</i>	138
Figura 35. Mucosidad de diferentes estirpes de <i>Sinorhizobium</i> en medio YMA en presencia o ausencia de flavonoides.....	148
Figura 36. Mucosidad de <i>S. fredii</i> HH103 y diferentes mutantes en YMA en ausencia o presencia de flavona o genisteína	150
Figura 37. Equivalentes de glucosa en el medio extracelular y capacidad de formación de <i>biofilm</i> de <i>S. fredii</i> HH103 y los mutantes <i>nodA</i> , <i>nodD1</i> , <i>nolR</i> y <i>exoA</i> crecidos en presencia (+) o ausencia (-) de genisteína	152
Figura 38. H-RMN (500.20 MHz, 353 K) de los polisacáridos aislados de los sobrenadantes de cultivos de YM de <i>S. fredii</i> HH103 y sus mutantes <i>nodD1</i> y <i>nolR</i> crecidos en ausencia (-) o presencia de genisteína (+).	154
Figura 39. Análisis de qRT-PCR del efecto de la genisteína en la expresión de los niveles de <i>exoA</i> , <i>exoK</i> y <i>exoY2</i> en <i>S. fredii</i> HH103 y sus mutantes <i>nodD1</i> y <i>nolR</i> en cultivos de fase estacionaria temprana (24h) y tardía (96h).....	157
Figura 40. Mucosidad en placas de YMA de <i>S. fredii</i> HH103 Rif ^R y los diferentes mutantes en los genes <i>mucR1</i> y <i>mucR2</i> en ausencia o en presencia de genisteína	166
Figura 41. Espectro de H-RMN (500 MHz, 353 K) de los polisacáridos extracelulares aislados de <i>S. fredii</i> HH103 Rif ^R , HH103 Δ <i>mucR1</i> , y HH103 Δ <i>mucR1C</i>	168
Figura 42. Formación de <i>biofilm</i> por <i>S. fredii</i> HH103 Rif ^R , su derivado <i>mucR1</i> (Δ <i>mucR1</i>) y la estirpe complementada de este mutante (Δ <i>mucR1C</i>) crecidos en presencia (+) o ausencia (-) de genisteína.....	169
Figura 43. Cubeta Coplin con varios portacristales usados para el análisis de la formación de <i>biofilm</i> sobre cristal de las diferentes estirpes de <i>S. fredii</i> HH103.....	170
Figura 44. Capacidad formadora de <i>biofilm</i> de <i>S. fredii</i> HH103 Rif ^R , el mutante Δ <i>mucR1</i> y la estirpe complementada (Δ <i>mucR1C</i>) portando el plásmido pSKDSRED sobre portacristales tras 24 horas de incubación en medio MGM	171

Figura 45. Capacidad formadora de <i>biofilm</i> de <i>S. fredii</i> HH103 Rif ^R , el mutante Δ <i>mucR1</i> y la estirpe complementada (Δ <i>mucR1C</i>) portando el plásmido pSKDSRED sobre portacristales después de 96 horas de incubación en medio MGM.....	172
Figura 46. Ensayo de auto-agregación de <i>S. fredii</i> HH103 Rif ^R y sus derivados <i>mucR1</i> y/o <i>mucR2</i>	173
Figura 47. Espectro de H-RMN (500 MHz) de extractos crudos celulares que contienen polisacáridos superficiales, SDS-PAGE con tinción con plata de extractos crudos de LPS y PAGE con tratamiento con azul alcian y tinción con plata de extractos crudos de KPS de <i>S. fredii</i> HH103 Rif ^R y sus derivados <i>mucR1</i> y/o <i>mucR2</i>	175
Figura 48. Espectro de H-RMN (500 MHz, 303 K) de fracciones que contienen GC extracelulares de sobrenadantes de cultivos líquidos de <i>S. fredii</i> HH103, HH103 Δ <i>mucR1</i> , HH103 Δ <i>mucR1C</i> , y un derivado <i>exoA</i> de HH103.....	177
Figura 49. Curvas de crecimiento de HH103, HH103 Δ <i>mucR1</i> y HH103 Δ <i>mucR1C</i> en medios TY, YM y MGM.	179
Figura 50. Ensayo de retardo en gel (EMSA) llevado a cabo para analizar la unión de MucR1 de <i>S. fredii</i> HH103 a la secuencia de su propio promotor.	183
Figura 51. Número de DEG en el mutante Δ <i>mucR1</i> respecto a la estirpe silvestre <i>S. fredii</i> HH103 Rif ^R en ausencia (-) o presencia (+) de genisteína	184

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Géneros y especies de rizobios aislados de soja	4
Tabla 2. Bacterias y plásmidos utilizados en esta Tesis	41
Tabla 3. Cebadores utilizados en esta Tesis para amplificar fragmentos de ADN para clonación.....	68
Tabla 4. Cebadores empleados en experimentos de RT-PCR	69
Tabla 5. Cebadores utilizados en esta Tesis para amplificar fragmentos de ADN para la mutagénesis <i>in vitro</i> por delección mediante PCR solapante.	71
Tabla 6. Cebadores utilizados en esta Tesis para ensayos de <i>q</i> PCR de genes de <i>S. fredii</i> HH103.	77
Tabla 7. Cebadores para la realización de la construcción promotor-GFP	80
Tabla 8. Cebadores para EMSA	89
Tabla 9. Plantas utilizadas en esta Tesis.....	89
Tabla 10. Respuesta de <i>G. max</i> cv. Williams y <i>V. unguiculata</i> a la inoculación con <i>S. fredii</i> HH103 y sus derivados <i>lpsL</i> y <i>rkpK</i>	110
Tabla 11. Respuesta de <i>L. burtii</i> y <i>L. japonicus</i> Gifu a la inoculación con mutantes de <i>S. fredii</i> HH103 afectados en los polisacáridos superficiales y <i>M. loti</i> NZP2235.....	133
Tabla 12. Porcentaje de identidad de las proteínas de tipo MucR/Ros en diferentes especies en comparación con las mismas de <i>S. fredii</i> HH103	165
Tabla 13. Respuesta de <i>G. max</i> cv. Williams a la inoculación con <i>S. fredii</i> HH103 y sus derivados <i>mucR1</i> y/o <i>mucR2</i>	180
Tabla 14. Respuesta de <i>L. burtii</i> a la inoculación con <i>S. fredii</i> HH103 y sus derivados <i>mucR1</i> y/o <i>mucR2</i>	181
Tabla 15. Ensayo de reducción de acetileno de <i>S. fredii</i> HH103 y su derivado <i>mucR1</i> en plantas de soja y <i>L. burtii</i>	181
Tabla 16. Validación de los datos de RNA-Seq usando <i>q</i> RT-PCR (<i>q</i> PCR).....	185

Tabla17. Efecto de la inactivación de <i>mucR1</i> sobre la expresión del regulon <i>nod</i> en ausencia y presencia de genisteína.	192
---	-----

ABREVIATURAS

ABC, del inglés ATP Binding Cassette

AcPse, ácido pseudoamínico

AGlc, ácido glucurónico

AON, autorregulación de la nodulación (del inglés Autorregulation Of Nodulation)

ARA, ensayo de reducción de acetileno (del inglés, Acetylene Reduction Assay)

CF, calcoflúor

DEG, genes diferencialmente expresados (del inglés, Differentially Expressed Genes)

di-GMPc, diguanilato cíclico

Dpi, días después de la inoculación (del inglés, Days Post Inoculation)

EMSA, ensayos de retardo en gel (del inglés Electrophoretic Mobility Shift Assay)

EPS, exopolisacárido

Fix, fijación

Gal, galactosa

GC, glucano cíclico

GFP, proteína fluorescente verde (del inglés, Green Fluorescent Protein)

Glc, glucosa

GPS, polisacárido formador de gel

GST, glutatión S-transferasa

HMW, alto peso molecular (del inglés, High Molecular Weight)

Kb, kilobase

KDa, KiloDalton

Kdo, ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico

Kdx, derivado del Kdo

KPS, polisacárido capsular de tipo antígeno-K

LCO, lipo-quito-oligosacárido

LMW, bajo peso molecular (del inglés, Low Molecular Weight)

LPS, lipopolisacárido

MMT, millones de toneladas métricas (del inglés Million Metric Tons)

MRO, del inglés Macroscopic Root Outgrowths

NAcGlc, N-acetilglucosamina

NB, caja *nod* (del inglés nod box)

NF, factor de nodulación (del inglés Nod Factor)

NFR, receptor de Factor Nod (del inglés, Nod Factor Receptor)

NO, óxido nítrico

Nod, nodulación

Nops, efectores (del inglés Nodulation Outer Proteins)

NP, polisacárido neutral

PAGE, del inglés PolyAcrilamide Gel Experiments

Pb, pares de bases

H-RMN, resonancia magnética nuclear (H-RMN)

ROS, especies reactivas de oxígeno (del inglés, Reactive Oxigen Species)

TI, tubo de infección (del inglés, Infection Thread)

TI-VSS, sistema de secreción de tipo I-V (del inglés, Type I-V Secretion System)

INTRODUCCIÓN

1. Los rizobios

En el suelo existe un grupo de proteobacterias, denominadas rizobios, capaces de establecer simbiosis con plantas de la familia *Leguminosae* mediante la formación de nuevos órganos llamados nódulos (Spaink *et al.*, 1998; Suzaki *et al.*, 2015). Los nódulos se pueden desarrollar en raíces y tallos donde los rizobios se diferencian a bacteroides y llevan a cabo la fijación del nitrógeno atmosférico (Peix *et al.*, 2015), también denominada fijación biológica del nitrógeno. Gracias a este proceso, el nitrógeno molecular se reduce hasta amonio, quedando en formas disponibles para la planta. Por su parte, la bacteria recibe fuentes de carbono y de energía de origen vegetal. Los rizobios pertenecen, en su gran mayoría, a la clase *Alphaproteobacteria* y al orden *Rhizobiales* (Madigan *et al.*, 2015). Dentro de las alfa proteobacterias, el orden *Rhizobiales* es el más amplio y en él se encuadran los rizobios como una colección polifilética de géneros. Existen nueve géneros pertenecientes a este orden que contienen rizobios: *Bradyrhizobium*, *Ochrobactrum*, *Azorhizobium*, *Devosia*, *Methylobacterium*, *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Sinorhizobium* (denominado actualmente como *Ensifer* (Willems, 2006), aunque se seguirá haciendo referencia al término *Sinorhizobium* por motivos históricos exclusivamente), y *Rhizobium* (Madigan *et al.*, 2015). Aunque la mayoría de los rizobios se encuentran en esta clase, existen algunos miembros de las clases *Betaproteobacteria* capaces de nodular leguminosas (Gyaneshwar *et al.*, 2011) (**Figura 1**).

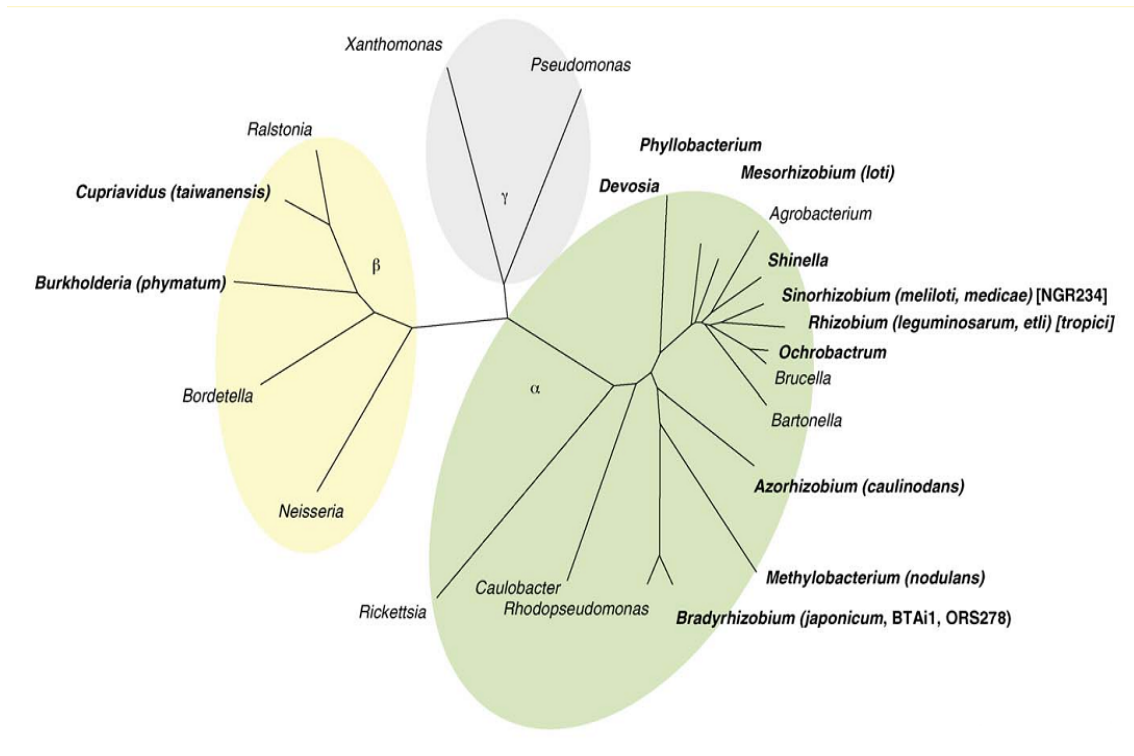


Figura 1. Árbol filogenético no enraizado de las secuencias de ADN ribosómico 16S de Alfa-, Beta- y Gammaproteobacterias seleccionadas. Los géneros en negrita contienen los rizobios. Las especies de rizobios o estirpes cuyos genomas han sido totalmente secuenciados están indicados entre paréntesis. Las secuencias de los genomas que han sido publicados son de *C. taiwanensis* (Amadou *et al.*, 2008), *M. loti* (Kaneko *et al.*, 2000), *S. meliloti* (Galibert *et al.*, 2001), *R. leguminosarum* (Young *et al.*, 2006), *R. etli* (González *et al.*, 2006), *S. fredii* NGR234 (Schmeisser *et al.*, 2009), *B. japonicum* (Kaneko *et al.*, 2002) y *B. sp.* BTAi1 y ORS278 (Giraud *et al.*, 2007). Los números de acceso para los genómas no publicados: CP001043-46 (*B. phymatum*), CP000738-41 (*S. medicae*) y CP001349-56 (*M. nodulans*). Figura tomada de Masson-Boivin *et al.* (2009).

2. La soja y su importancia en la sociedad

La enorme importancia ecológica y económica de los cultivos de leguminosas explica en gran medida el número de estudios llevados a cabo durante las últimas cuatro décadas sobre la simbiosis rizobio-leguminosa. Existen diferentes especies pertenecientes a los géneros *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* que son capaces de inducir la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de soja (Margaret *et al.*, 2011; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2011). La soja, cuyo nombre científico es *Glycine max* (L.) Merr, es la leguminosa más importante agronómicamente a nivel mundial. Sus semillas son de gran interés alimenticio debido a su contenido proteico y además son de gran utilidad para llevar a cabo la extracción de aceites vegetales. Se estima que los cultivos de soja ocupan el 6% de los terrenos cultivables en el mundo, y en las últimas cuatro décadas,

el área de producción de esta planta tiene el mayor porcentaje de incremento en comparación con cualquier otro cultivo relevante (Hartman *et al.*, 2011). El incremento en la producción de la soja está directamente relacionado con el aumento de la demanda de alimento y aceite de soja. La producción de esta leguminosa se ha incrementado desde 17 millones de toneladas métricas (MMT, del inglés *Million Metric Tons*) en 1960 hasta 230 MMT en 2008 (Hartman *et al.*, 2011). Actualmente, se espera que dicha producción crezca más que en otros cultivos debido a la inclusión de nuevas áreas de producción y a la obtención de mayor rendimiento en las cosechas. La soja no sólo es importante como alimento proteico o para la producción de aceite vegetal, sino también porque representa una fuente rica en productos “nutracéuticos” (de *nutraceutical*, alimentos beneficiosos para la salud) de gran relevancia como flavonoides, lecitinas, oligosacáridos, fitoesteroles, saponinas y tocoferoles. Como ejemplo, las isoflavonas de soja disminuyen la degeneración ósea en las mujeres (Chen *et al.*, 2003) y los riesgos de aparición de cáncer (Hamilton-Reeves *et al.*, 2007). Incluso existen trabajos que demuestran que la ingesta de soja puede reducir el contenido de colesterol en sangre (Rosell *et al.*, 2004).

3. Rizobios capaces de nodular soja

Las bacterias pertenecientes a la especie *S. fredii* se describieron por primera vez en 1982 (Keyser *et al.*, 1982), lo que supuso un gran avance puesto que eran las primeras bacterias de crecimiento rápido (1,5-3 horas de tiempo de generación) capaces de nodular soja. Hasta esa fecha, todos los simbioses de soja conocidos eran bacterias de crecimiento lento (6 o más horas de tiempo de generación) que se agrupaban en la especie *Bradyrhizobium japonicum*. A través de estudios serológicos y comparaciones de homología de ADN, entre otras pruebas, se diferenció un subgrupo de estirpes dentro de una nueva especie denominada *B. elkanii* (Kuykendall *et al.*, 1992; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2011). Las primeras estirpes de *S. fredii* aisladas sólo eran capaces de nodular sojas asiáticas, mientras que en sojas americanas (las más utilizadas en agricultura), sólo inducían pseudonódulos. Fue en 1985, cuando se aislaron nuevas estirpes de *S. fredii* de la provincia de Hubei que eran capaces de nodular sojas americanas, además de la variedades asiáticas, y entre estas nuevas estirpes se incluye *S. fredii* HH103 (Dowdle y Bohlool, 1985). Además, dentro de las especies de rizobios que presentan una tasa de

crecimiento intermedia entre los rápidos y los lentos, también se incluyen rizobios del género *Mesorhizobium*, capaces de nodular soja y que fueron aislados principalmente de suelos áridos y salinos. Concretamente se aislaron estirpes que pertenecían a la especie *M. tianshanense* (Chen *et al.*, 1995) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Géneros y especies de rizobios aislados de soja.

Género	Especie	Velocidad de crecimiento en medio YM	Referencia
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	Lenta	Jordan, 1982
	<i>elkanii</i>	Lenta	Kuykendall <i>et al.</i> , 1992
	<i>liaoningense</i>	Lenta	Xu <i>et al.</i> , 1995
<i>Mesorhizobium</i>	<i>tianshanense</i>	Media	Chen <i>et al.</i> , 1995
<i>Sinorhizobium</i>	<i>fredii</i>	Rápida	Chen <i>et al.</i> , 1995
	<i>xinjiangense</i>	Rápida	Chen <i>et al.</i> , 1995

Dentro de la especie *S. fredii*, pueden destacarse tres estirpes concretas como las más estudiadas. Curiosamente estas estirpes difieren en su fenotipo simbiótico en soja.

- *S. fredii* NGR234, inicialmente descrita como *Rhizobium* sp. NGR234. Su rango de nodulación descrito es el más amplio conocido. En un estudio realizado con 452 especies de leguminosas, NGR234 fue capaz de nodular el 51%, 232 especies pertenecientes a 112 géneros distintos (Pueppke y Broughton, 1999). Curiosamente, NGR234 no es capaz de nodular soja. Estudios filogenéticos que incluyeron el análisis de la secuencia del ARNr 16S permitieron reclasificar a esta estirpe dentro de la especie *S. fredii* (Saldaña *et al.*, 2003).

- *S. fredii* USDA257, aislada en el grupo de estirpes de 1982 y por lo tanto incapaz de nodular variedades americanas de soja. Su rango de nodulación es amplio, pero inferior

al de NGR234: en el estudio comentado anteriormente, noduló en 135 especies (el 30% de las analizadas) pertenecientes a 79 géneros (Pueppke y Broughton, 1999).

- *S. fredii* HH103, aislada en 1985. Aunque no se ha llevado a cabo un estudio exhaustivo de su rango de nodulación, en las leguminosas ensayadas coincide con el de USDA257 y, por tanto, incluye tanto plantas formadoras de nódulos determinados como formadoras de nódulos indeterminados (Margaret *et al.*, 2011; López-Baena *et al.*, 2016). Es de destacar que es capaz de nodular tanto variedades asiáticas como americanas de soja, lo cual potencia su valor como posible inoculante de interés agrícola.

El genoma de *S. fredii* HH103 ha sido secuenciado recientemente y se estructura en siete replicones: el cromosoma (~4,3 Mb) y seis plásmidos, denominados con una letra en función de su tamaño, pSfhh103a1 (~24 Kb), pSfhh103a2 (~25 Kb), pSfhh103b (~62 Kb), pSfhh103c (~144 Kb), pSfhh103d (~589 Kb) y pSfhh103e (~2,1 Mb). Los genes responsables de la nodulación y fijación se localizan en el denominado plásmido simbiótico, pSfHH103d; mientras que los genes relacionados con la producción de polisacáridos se encuentran principalmente en el cromosoma y en el plásmido pSfHH103e. Además, esta estirpe posee un gran número de genes relacionados con la secreción de proteínas, de tal modo que se han localizado genes que codifican para los sistemas de secreción desde el tipo I al IV (Vinardell *et al.*, 2015).

4. Establecimiento del proceso simbiótico

La simbiosis entre los rizobios y las leguminosas es el resultado de una combinación de factores selectivos, genéticos y ambientales, que han condicionado la expansión exitosa en las bacterias del suelo de una serie de rasgos que han sustentado la simbiosis con las leguminosas. Esta larga co-evolución entre la planta hospedadora y la bacteria puede haber sido muy importante para refinar la interacción entre ambos, sobre todo cuando ésta se encuentra en una fase inicial o joven (Remigi *et al.*, 2015).

El proceso simbiótico comienza con la secreción, por parte de la raíz, de una serie de compuestos fenólicos denominados flavonoides. La secreción de los flavonoides se realiza de forma constitutiva en niveles muy bajos; sin embargo, su concentración aumenta si en la rizosfera se encuentran rizobios compatibles con la leguminosa

presente (Broughton *et al.*, 2000). En función de la especie de leguminosa, se secretan diferentes grupos o cócteles de flavonoides que determinan una de las barreras de especificidad simbiótica (Hassan y Mathesius, 2012; Liu y Murray, 2016). Los flavonoides difunden a través de la membrana bacteriana de tal modo que interaccionan con la proteína reguladora NodD (Peck, 2013) y, si son compatibles, activarán la transcripción de los genes de nodulación bacterianos. Además, existen otros compuestos de la planta como betaínas, xantonas, ácidos aldónicos, jasmonatos y compuestos fenólicos simples, que funcionan como inductores de los genes de nodulación de los rizobios (Janczarek *et al.*, 2015). NodD se expresa constitutivamente y codifica un regulador transcripcional de tipo LysR que, en presencia de los flavonoides adecuados, reconoce y se une a *nod boxes* (NB), secuencias promotoras localizadas aguas arriba de los genes de nodulación, activando su transcripción (Schlaman *et al.*, 1998; Spaink, 2000, Peck *et al.*, 2006). Estos genes, que están involucrados en las primeras etapas de la simbiosis, a menudo se localizan en islas cromosómicas o en plásmidos (Gibson *et al.*, 2008). Entre los genes de nodulación se encuentran los genes que codifican las enzimas responsables de la síntesis de los factores de nodulación (NF, del inglés *Nod Factor*) y, con la excepción de un bradyrhizobio fototintético capaz de nodular especies de *Aeschynomene* (Giraud *et al.*, 2007), están presentes en todos los rizobios conocidos. Los genes de nodulación se pueden clasificar en tres grupos: los implicados en la síntesis de la estructura básica de los NF (*nodABC*, comunes), los genes que adicionan modificaciones a la estructura básica, que son específicos de especie (*nodeF*, *nodG*, etc., específicos), y los genes implicados en la regulación de la transcripción de los genes de nodulación anteriores (*nodD*, *nolR*, *nodVW*, etc) (Jones *et al.*, 2007; Gibson *et al.*, 2008; Deakin y Broughton 2009; Downie, 2010; Wang *et al.*, 2012, Janczarek *et al.*, 2015; López-Baena *et al.*, 2016). Los NF producidos por los rizobios poseen un esqueleto de quito-oligosacárido que generalmente está constituido por tres o cinco residuos (aunque pueden estar formados por 2 unidades como mínimo y 6 como máximo) de *N*-acetilglucosamina (NAcGlc) unidos por enlaces β -1,4. En el azúcar del extremo no reductor se encuentra un grupo *N*-acilado. Este lipo-quito-oligosacárido *N*-acilado (LCO) puede ser decorado con una amplia variedad de sustituyentes que se unen a las unidades de NAcGlc, como grupos metilo, fucosilo, acetilo, sulfato, etc. Las distintas decoraciones, junto con la longitud y el grado de saturaciones del grupo *N*-acilado dan lugar a una amplia variedad de NF producidos

por cada rizobio, lo que constituye otro punto importante, quizás el principal, para la especificidad entre el rizobio y la leguminosa hospedadora (Jones *et al.*, 2007, Oldroyd y Downie, 2008; Oldroyd, 2013; López-Baena *et al.*, 2016).

La percepción de los NF en las leguminosas está mediada por los receptores de los NF (NFRs, del inglés *Nod Factor Receptors*), receptores de membrana de tipo serina/treonina quinasas que contienen un motivo LysM en su dominio extracelular. Estos NFRs establecen otro determinante de especificidad del hospedador junto con la secreción del cóctel de flavonoides (Wang *et al.*, 2012). Tras el reconocimiento de los NF, se produce la vía de señalización de la simbiosis, en la que se producen oscilaciones en los niveles de Ca^{2+} intracelular que se inician en las células epidérmicas de la raíz, y después también se extienden a las células corticales (Oldroyd, 2013) (**Figura 2**).

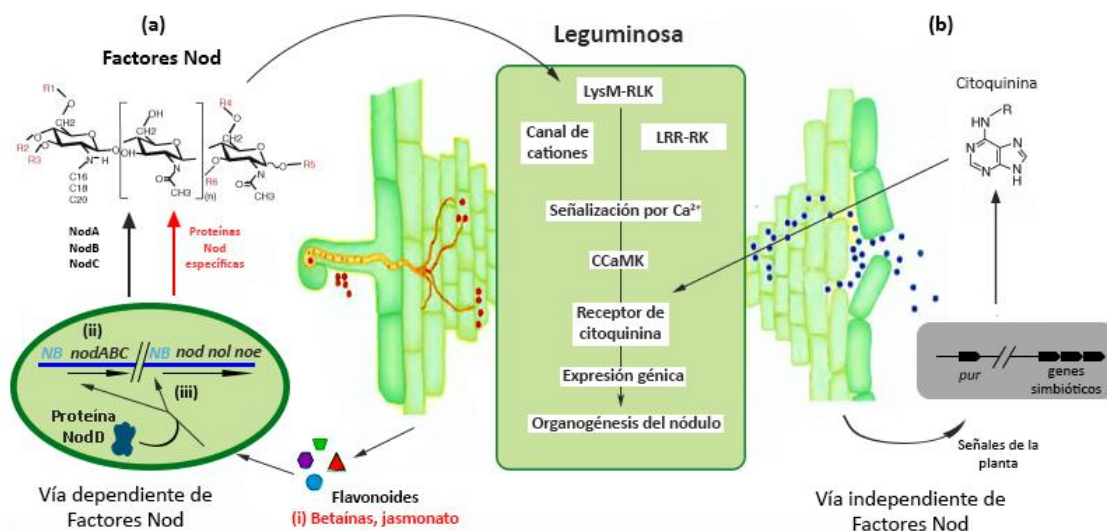


Figura 2. Estrategias de nodulación en los rizobios. **a)** Inducción de la formación de nódulos en las leguminosas por la vía dependiente de los NF. En rojo se indican los compuestos o genes variables: (i) compuestos alternativos excretados por la planta, (ii) reguladores posteriores a *nodD* que pueden modular la expresión de los genes *nod*, (iii) aunque el esqueleto de los NF es controlado por los genes *nodABC*, la combinación con otros genes de nodulación (*nod*, *nol* y *noe*), específicos de estirpe, puede variar las decoraciones de los NF. **b)** Proceso de formación del nódulo independientemente de los NF. La acumulación en la zona de infección de compuestos como la citoquinina, sintetizados por la bacteria, podría disparar la organogénesis del nódulo directamente. Figura adaptada de Downie (2007).

Este proceso provoca la curvatura del pelo radical que atrapa íntimamente a una población de bacterias unidas al extremo del pelo radical y la internaliza a través de unas estructuras formadas por el hospedador llamadas tubos de infección. El tubo de infección es una invaginación de la membrana plasmática del pelo radical y se inicia

gracias a una hidrólisis localizada de la pared celular y que continúa creciendo por deposición de nuevo material de la pared celular. De este modo, el tubo de infección lleva a las bacterias desde la superficie de la raíz hasta las células simbióticas del nódulo en formación. La percepción de los NF también desencadena la formación de primordios nodulares en el córtex radical. Dentro de los primordios, una población de células se va a diferenciar mediante endoreduplicación, lo que resulta en células poliploides de gran tamaño (células simbióticas) destinadas a acoger y alimentar cientos o miles de bacterias. (Vinardell *et al.*, 2003; Gibson *et al.*, 2008; Suzaki *et al.*, 2015). Los tubos de infección se ramifican durante su progresión a través del córtex y alcanzan las células simbióticas en las cuales las bacterias son liberadas mediante un proceso de endocitosis en el cual quedan rodeadas por una membrana procedente del hospedador (membrana peribacteroidea) a través de la cual se produce el intercambio de metabolitos entre la célula vegetal y la bacteria. Finalmente, las bacterias sufren un programa de diferenciación gracias al cual alcanzan un estado (bacteroide) que les confiere la capacidad de catalizar la fijación del nitrógeno atmosférico. El bacteroide (o grupo de bacteroides) rodeado de la peribacteroidea se denomina simbiosoma (Gibson *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012; Oldroyd, 2013).

La vía de infección a través de los pelos radicales es considerada la más evolucionada. Sin embargo, existe otra vía de infección de los rizobios en raíces de leguminosas denominada *crack entry*. En esta vía, la bacteria entra por roturas que se originan en las raíces laterales que emergen, no se forman tubos de infección y las células infectadas no se intercalan con las no infectadas como ocurre en la vía por tubo de infección (Sprent, 2007). Además, el *crack entry* es un sistema que puede desarrollarse de forma dependiente de NF (Madsen *et al.*, 2010) o, como ocurre en especies de *Bradyrhizobium*, de forma independiente de NF (Giraud *et al.*, 2007). Este sistema de infección tiene su origen en la que es considerada la base de la infección rizobiana, la denominada infección intracelular simple (Madsen *et al.*, 2010) (**Figura 3**).

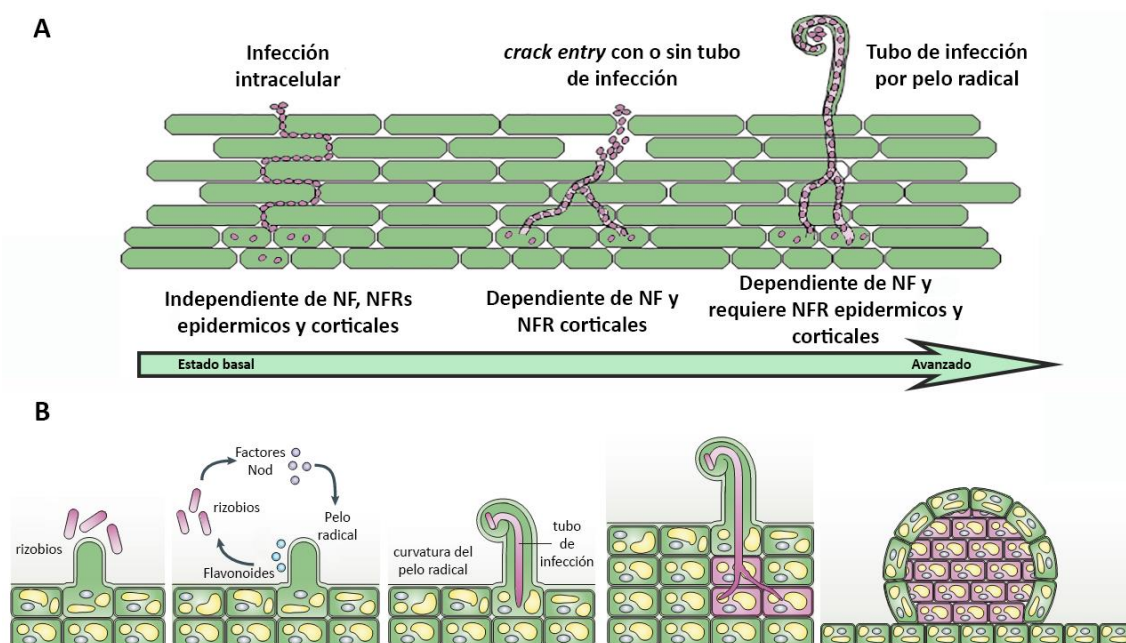


Figura 3. a) Modelo de evolución de las vías de infección en leguminosas. **b)** Proceso de desarrollo nodular a través de la vía dependiente de NF. Figura adaptada de Deakin y Broughton (2009) y Madsen *et al.* (2010).

La nodulación es un proceso beneficioso para la planta. Sin embargo, la formación de un número excesivo de nódulos puede ser una desventaja debido a que un alto porcentaje de los fotosintatos, que normalmente se usan para el crecimiento de la planta, pueden ser consumidos en el desarrollo y mantenimiento del nódulo. Por ello, con objeto de equilibrar beneficios y costes, las leguminosas tienen un mecanismo genético denominado autorregulación de la nodulación (AON, del inglés *Autorregulation Of Nodulation*), el cual controla de forma estricta el número de nódulos y lo adapta a las necesidades de nitrógeno de la planta (Caetano-Anolles y Gresshoff, 1991; Oka-Kira y Kawaguchi, 2006; Mortier *et al.*, 2012; Suzaki *et al.*, 2015).

La forma y estructura del nódulo dependen exclusivamente de la planta hospedadora y está directamente relacionado con la posición taxonómica de la misma (Sprent, 2007). Los tipos de nódulos se pueden dividir principalmente en dos tipos morfológicos: Nódulos determinados, cuyo primordio se forma en el córtex externo (Ferguson *et al.*, 2010) y da lugar a un meristemo con actividad transitoria, por lo que todas las células simbióticas se encuentran en el mismo estado de maduración y las células endorreduplicadas, que albergan simbiosomas con múltiples bacteroides, ocupan la

parte central. En los nódulos determinados no se pueden distinguir ninguna de sus partes, a diferencia de lo que ocurre en los nódulos indeterminados. En éstos, el primordio se genera en el córtex interno (Ferguson *et al.*, 2010) y posee un meristemo apical persistente que da lugar a un crecimiento continuo del nódulo. Por ello, en este tipo de nódulos se pueden distinguir las diferentes zonas según el grado de diferenciación de las células. De la parte apical a la basal: zona meristemática, la zona de infección (células poliploides), la zona de fijación (cuyas células contienen simbiosomas fijadores de nitrógeno) y zona de senescencia (Kondorosi *et al.*, 2013; Suzaki *et al.*, 2015).

5. Sistemas de Secreción

En bacterias Gram negativas existen dos barreras que dificultan el paso de las moléculas a través de las membranas, la membrana interna y la membrana externa (Fauvart y Michiels, 2008). Las bacterias usan una amplia variedad de sistemas de secreción (SS) para exportar proteínas y otros compuestos a través de sus membranas y paredes celulares. Cada uno de los sistemas de secreción ha evolucionado independientemente, conteniendo cada uno un conjunto básico de proteínas diferentes. (Nelson y Sadowski, 2015). Se piensa que los sistemas de secreción de tipo I, tipo II y tipo V (T1SS, T2SS y T5SS, del inglés *Type 1, 2 or 5 Secretion System*) son simples transportadores de proteínas al exterior de la célula. Los sistemas T3SS, T4SS y T6SS contienen subfamilias con la capacidad de transportar proteínas efectoras al citosol de las células eucariotas (Wooldridge, 2009). Los genes que codifican para los T3SS, T4SS y T6SS juegan papeles cruciales en las interacciones animal y planta-bacteria (Tseng *et al.*, 2009) y en el caso de los rizobios estos sistemas de secreción están involucrados en la determinación del rango de hospedador mediante la introducción de proteínas efectoras que podrían modular la respuesta defensiva de la planta (Soto *et al.*, 2006; Fauvart y Michiels, 2008; Sugawara *et al.*, 2013; López-Baena *et al.*, 2016).

5.1. Sistema de Secreción de Tipo 3

El T3SS es una estructura, compuesta por 20-27 proteínas, responsable de la secreción de proteínas bacterianas en el citoplasma de células del hospedador eucariótico (Ghosh, 2004; Tampakaki, 2014). Es un sistema habitual de bacterias patógenas de plantas y animales, pero también aparece en bacterias simbiotes como los rizobios. Este sistema

se extiende desde la membrana interna hasta la membrana externa, atravesando el espacio periplásmico, y se prolonga hacia el exterior a través de un apéndice cilíndrico extracelular o *pilus*, el cual forma un conducto estrecho necesario para la secreción e inyección de proteínas, llamadas efectores, directamente al interior de la célula hospedadora (Fauvart *et al.*, 2008; Nelson y Sadowski, 2015; Staehelin y Krishnan, 2015; López-Baena *et al.*, 2016). El termino efector se refiere a un grupo de proteínas secretadas a través del T3SS que ejerce su función principalmente dentro de la célula hospedadora (Pallen *et al.*, 2003) donde alteran rutas de señalización y suprimen la respuesta defensiva, proporcionando un ambiente beneficioso para la multiplicación bacteriana (Jones y Dangl, 2006; Jiménez-Guerrero *et al.*, 2015; López -Baena *et al.*, 2016). En los rizobios, esas proteínas efectoras se denominan Nops (del inglés *Nodulation Outer Proteins*), y su expresión parece comenzar en las etapas tempranas de la simbiosis (tubo de infección), aunque se mantiene en nódulos totalmente desarrollados (Perret *et al.*, 1999; Krishnan, 2002; Zehner *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011; Kim y Krishnan, 2014). Existen ciertas Nops que parecen ser secretadas primero a la interfaz simbiótica (espacio comprendido entre la superficie bacteriana y de la célula vegetal) y entonces pueden ponerse en contacto directo con los materiales de la pared celular en los tubos de infección y la superficie de la membrana plásmática. De hecho, algunas Nops son posibles degradadores de la pared celular que podrían facilitar la translocación de los efectores a las células hospedadoras (Ji y Dong, 2015; Staehelin y Krishnan, 2015).

Generalmente los genes codificantes de las proteínas que constituyen el T3SS se encuentran en islas de patogenicidad de unas 22-50 Kb (Nelson y Sadowski, 2015). En rizobios, la expresión de estos genes es inducible por la presencia de flavonoides inductores, y requiere dos reguladores transcripcionales: NodD y TtsI (Viprey *et al.*, 1998; Krause *et al.*, 2002; Marie *et al.*, 2003; López-Baena *et al.*, 2008). Este último regulador se expresa en presencia de flavonoides inductores debido a la presencia de una caja *nod* en su región promotora. A su vez, TtsI se une a regiones conservadas localizadas en las regiones promotoras de los genes implicados en la síntesis del T3SS, llamadas cajas *tts*, activando su transcripción (**Figura 4**).

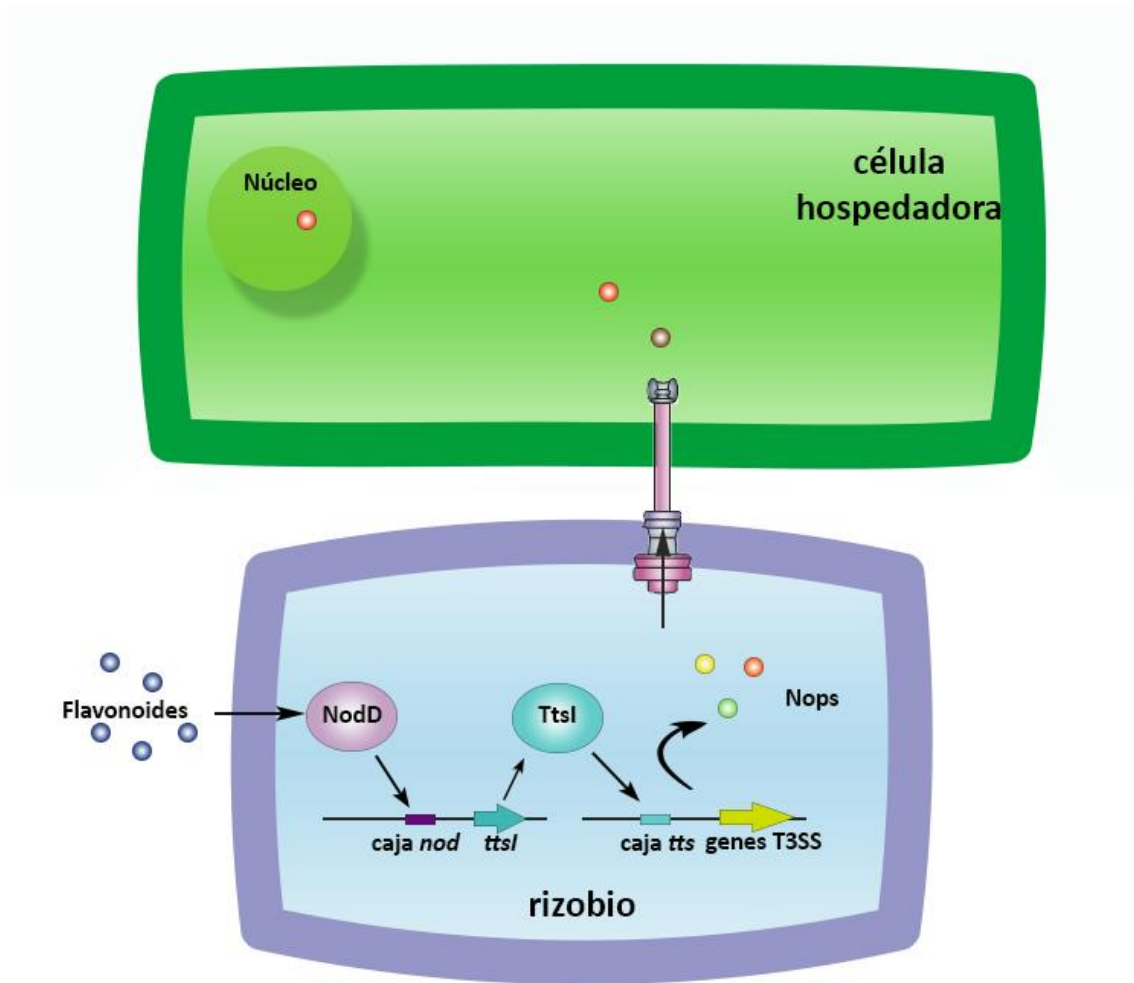


Figura 4. Esquema de regulación de la secreción de Nops a través del T3SS en *S. fredii* HH103 (basado en figura de López-Baena *et al.*, 2016).

6. Fine-tuning de la expresión de los genes *nod*

En los rizobios, la expresión de los genes de nodulación y fijación de nitrógeno está sujeta a una doble regulación, positiva y negativa. De este modo se propicia una nodulación óptima y un eficiente metabolismo de la planta una vez fijado el nitrógeno atmosférico (Kondorosi *et al.*, 1989; Loh y Stacey, 2003). La regulación positiva está mediada por los productos de los genes *nodD* y *syrM* (Long, 1996), mientras que la regulación negativa se lleva a cabo por una proteína represora codificada por el gen *noIR* (Sugawara y Sadowsky, 2013) (**Figura 5**).

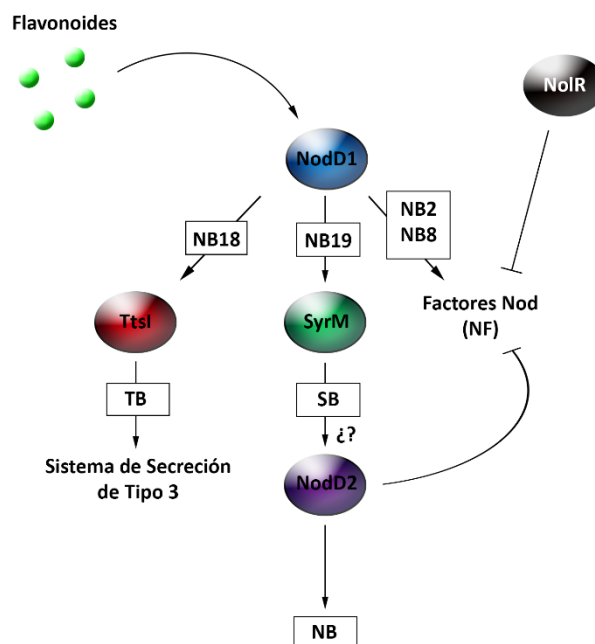


Figura 5. Esquema de regulación de la expresión de los genes nod mediada por los principales reguladores en *S. fredii* HH103. NB: *nod box*, SB: *syrM box*. Las líneas acabadas en flechas significan activación, mientras que las acabadas en una línea transversal significan inhibición. Figura adaptada de Pérez-Montaña *et al.* (2016).

6.1. NodD

La proteína NodD pertenece a la familia de activadores transcripcionales de tipo LysR. Los miembros de esta familia tienen aproximadamente 35 kDa y poseen un dominio de unión a ADN de tipo hélice-vuelta-hélice en el extremo N-terminal. Frecuentemente muestran auto-represión y normalmente requieren de moléculas inductoras para llevar a cabo su actividad. De este modo, estos activadores son capaces de transducir las señales extracelulares directamente a transcripción génica (Schell, 1993). Estos inductores pueden afectar la interacción con el ADN por estimulación del cambio de afinidad en la unión con el ADN (Wang *et al.*, 1992; Dangel *et al.*, 2005) o alterar la arquitectura de la proteína (Hryniewicz y Kredich, 1994; Toledano *et al.*, 1994; Parsek *et al.*, 1995; Rhee *et al.*, 1998), por ejemplo cambiando la conformación de los activadores para exponer dominios que interaccionan con la ARN polimerasa y facilitar así complejos de transcripción (Wek y Hatfield, 1988; Adhya *et al.*, 1993; Kullik *et al.*, 1995). Aunque existen evidencias que indican que NodD está directamente involucrado en la

percepción de los flavonoides (Peck *et al.*, 2006), no se ha demostrado que los flavonoides se unan directamente a esta proteína. Recientemente se ha propuesto que los flavonoides inducen aumentos transitorios en la concentración intracelular de Ca^{2+} de los rizobios, y que NodD actuaría posteriormente a dichos cambios (Moscatiello *et al.*, 2010). Asimismo, en *Rhizobium tropici* la proteína NodD2 es capaz de activar la expresión de genes *nod* (y por tanto promover la producción de NF) en respuestas a altas concentraciones de sal en ausencia de flavonoides (del Cerro *et al.*, 2017). En cualquier caso, durante la activación transcripcional, NodD se une a las secuencias denominadas *nod box*, compuestas por 55 pb altamente conservadas y localizadas en las regiones promotoras de los genes *nod* (Rostas *et al.*, 1986; Fisher *et al.*, 1988).

La proteína NodD se ha encontrado en todas las especies de rizobios (Spaink *et al.*, 1987; Schlaman *et al.*, 1998) y su número de copias varía entre 1 y 5 según la especie (Spaink, 2000). Las proteínas NodD de los diferentes rizobios tienen distinta sensibilidad a flavonoides, lo que provoca que cada rizobio pueda responder de modo diferente a los exudados de cada leguminosa (Horvath *et al.*, 1987; Spaink *et al.*, 1987; Bender *et al.*, 1988).

Algunas especies de rizobios, por ejemplo *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, tienen un solo gen *nodD*, mientras que *B. japonicum*, *S. fredii*, *S. meliloti* y *R. tropici* poseen de dos a cinco copias de este gen (van Rhijn *et al.*, 1993). En concreto, las estirpes de *S. fredii*, como HH103, poseen dos copias del gen *nodD*, *nodD1* y *nodD2* (Vinardell *et al.*, 2015). En *S. fredii* NGR234, *nodD2* actúa como represor del operón *nodABCInolOnoel*. A su vez, la transcripción de *nodD2* en esta estirpe está mediada por SyrM2 debido a la presencia de una *syrM box* en su región promotora. Además, *nodD2* está involucrado en la especificidad del hospedador, debido a que mutaciones en *nodD2* en NGR234 siguen permitiendo la nodulación en plantas como *Leucaena leucocephala* pero da lugar a un fenotipo Fix^- y a nódulos vacíos en *Vigna unguiculata* y *Tephrosia vogelii* respectivamente (Kobayashi *et al.*, 2004). Este tipo de estudios pone de manifiesto una interacción compleja entre los diversos reguladores de los genes *nod*.

6.2. NoIR

El gen *nolR* se encuentra bastante conservado en el género *Sinorhizobium* (Sugawara *et al.*, 2013), y también está presente en otros rizobios como *Rhizobium leguminosarum*

(Kiss *et al.*, 2001) e incluso en géneros relacionados como la alfaproteobacteria *Brucella* (Caswell *et al.*, 2013). Este gen codifica una proteína perteneciente a la familia de los reguladores de tipo hélice-vuelta-hélice de modo que se une a secuencias conservadas no palindrómicas [(A/T) TTAG-N₉-A(T/A)] regulando la expresión génica (Kondorosi *et al.*, 1991).

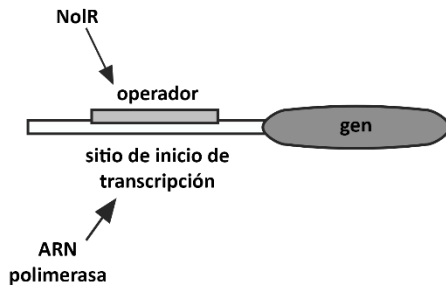
En *S. meliloti*, NolR modula la expresión del activador NodD y de los genes *nod* que codifican para el esqueleto de los NF (Kondorosi *et al.*, 1991; Cren *et al.*, 1994; Cren *et al.*, 1995), de modo que se ha propuesto que su efecto es el de asegurar la producción de factores Nod plenamente decorados. Sin embargo, en *S. fredii* HH103 NolR reprime tanto los genes *nod* comunes como los específicos, además de la secreción de proteínas a través del T3SS, y potencia la producción de exopolisacáridos (Vinardell *et al.*, 2004a; López-Baena *et al.*, 2008). Más concretamente, se han encontrado regiones de unión de la proteína NolR en regiones de inicio de transcripción de los genes *nodD1*, *nodD2*, *nodA*, *ttsI-nodD2*, *nolR*, *hesB* y *nodZ* (Kondorosi *et al.*, 1991; Vinardell *et al.*, 2004a), demostrando que NolR es un regulador global que responde a factores ambientales para “afinar” la respuesta de las señales simbióticas.

Se han propuesto dos posibles modelos para explicar la interacción de NolR con las regiones del operador de los genes de nodulación (Lee *et al.*, 2014) (**Figura 6**):

1.- NolR se une al operador dentro del inicio de transcripción del gen diana, de tal modo que podría competir directamente con la ARN polimerasa por el sitio de unión en la región promotora. Este modelo es lo que podría ocurrir en las zonas de unión de *nodD1*, *nodZ* y *nolR*, donde el operador se posiciona 15-60 pb aguas arriba de la región codificante (Vinardell *et al.*, 2004a).

2.- La unión de NolR al sitio del operador altera el reconocimiento de NodD sobre la caja *nod* o la interacción con la ARN polimerasa en el sitio de inicio de transcripción. De este modo NolR puede que compita físicamente con NodD por el sitio de unión de la caja *nod* o que altere la región de unión al plegar el promotor impidiendo la unión de NodD, de modo que reprime la expresión de los genes de nodulación que se encuentran aguas abajo.

Modelo 1:



Modelo 2:

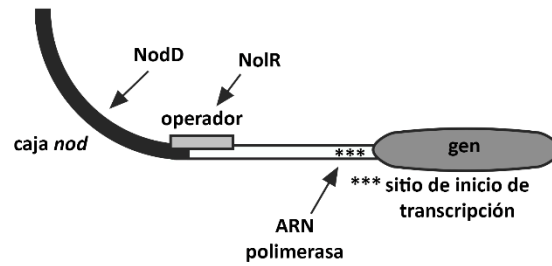


Figura 6. Modelos de regulación de la expresión de los genes de nodulación por NoIR. Figura adaptada de Lee *et al.* (2014).

6.3. SyrM

SyrM tiene una secuencia aminoacídica similar a la de las proteínas NodD (Barnett y Long, 1990) y como tal, pertenece a la familia de activadores transcripcionales de tipo LysR (Henikoff *et al.*, 1988). En *S. meliloti*, del cual se ha obtenido la mayoría de la información de este regulador, la transcripción de *syrM* se activa mediante la unión de NodD3 a una secuencia *nod box* situada aguas arriba de *syrM* y éste a su vez activa la transcripción de *nodD3*, formando así un circuito auto-amplificante (Swanson *et al.*, 1993; Barnett *et al.*, 1996; Barnett *et al.*, 2004). Cabe destacar que NodD3 es uno de los reguladores transcripcionales de tipo LysR que no requiere compuestos específicos de la planta para activar la expresión de los genes *nod*, sino que es activado por SyrM (Maillet *et al.*, 1990; Kondorosi *et al.*, 1991; Swanson *et al.*, 1993).

Además de *nodD3*, SyrM activa la transcripción del gen *syrA*, involucrado en la producción de exopolisacárido (EPS), ya que la sobre-expresión de este último gen provoca un incremento drástico de la producción de EPS I (Mulligan y Long, 1989; Barnett *et al.*, 1998).

Para que se lleve a cabo la activación de la expresión tanto de *nodD3* como de *syrA*, SyrM se une a unas secuencias específicas conservadas que se encuentran en regiones aguas arriba de ambos genes y a las que se les denomina *SyrM box* (Barnett *et al.*, 1996).

De este modo, y al menos cuando se encuentra sobre-expresado, SyrM parece controlar de forma coordinada tanto la síntesis de los NF, vía *nodD3*, como la producción de EPS I, vía *syrA*. Este hecho no se lleva a cabo si la bacteria carece de alguno de los dos reguladores, *nodD3* y/o *syrA*, ya que la sobre-expresión de *syrM* no tiene ningún efecto sobre los NF o la producción de EPS I en ausencia de alguno de los dos reguladores (Dusha y Kondorosi, 1993; Dusha *et al.*, 1999). Aún en presencia de *nodD3*, la sobre-expresión de *syrM* sólo provoca una modesta activación de la expresión de los genes *nod* (Barnett y Long, 2015).

En el caso de *S. fredii* HH103, el gen *syrM* se encuentra en el plásmido simbiótico y aguas arriba se localiza una secuencia *nod box* (NB19) (Vinardell *et al.*, 2015), por lo que su transcripción se activa por la vía dependiente de flavonoides-NodD1. Se han identificado dos posibles SyrM *box* aguas arriba de dos operones que pueden estar regulados por SyrM, y entre los genes que los componen se localiza el regulador transcripcional *nodD2* (Pérez-Montaña *et al.*, 2016). Este sistema regulador ocurre de igual forma en la estirpe NGR234, donde *syrM2* es activado por la vía flavonoides-NodD1, y, a su vez, activa la transcripción del regulador *nodD2* (Kobayashi *et al.*, 2004).

7. Superficie rizobiana

Los NF son capaces por sí solos de iniciar la deformación del pelo radical y la curvatura del mismo, y también son necesarios para la formación de los primordios nodulares. Sin embargo, no son suficientes para que tenga lugar el proceso de infección y se complete la diferenciación de los nódulos (Frayse *et al.*, 2003). La invasión rizobiana de los nódulos mediante tubos de infección está fuertemente influenciada por otras señales moleculares rizobianas como proteínas efectoras y diversos polisacáridos superficiales bacterianos (Gibson *et al.*, 2008; Downie, 2010; Janczarek, 2011; Janczarek *et al.*, 2015). Estos últimos juegan un papel crucial en la interacción simbiótica, actuando como señales requeridas para la progresión de la interacción y/o previniendo los mecanismos de defensa del hospedador (D'Haeze *et al.*, 2004).

En los rizobios se pueden distinguir al menos siete tipos diferentes de polisacáridos superficiales que pueden jugar papeles importantes en distintas fases de la interacción simbiótica, incluyendo unión a raíces, reconocimiento del hospedador, formación del tubo de infección e invasión de los nódulos: el exopolisacárido (EPS), el lipopolisacárido

(LPS), el polisacárido capsular de tipo antígeno-K (KPS), los glucanos cíclicos (GC), el polisacárido neutral o glucomanano (NP), el polisacárido formador de gel (GPS) y las fibrillas de celulosa (Janczarek *et al.*, 2015).

Los cuatros polisacáridos que han sido estudiados en mayor profundidad son EPS, GC, LPS y KPS (López-Baena *et al.*, 2016). Estos polisacáridos superficiales se sitúan en diferentes zonas de la superficie bacteriana. El EPS se localiza en el exterior de la célula sin unión o con una ligera asociación a la membrana externa, los GC se encuentran en el espacio periplásmico o extracelularmente, mientras que el LPS y el KPS son constituyentes de la membrana externa (**Figura 7**).

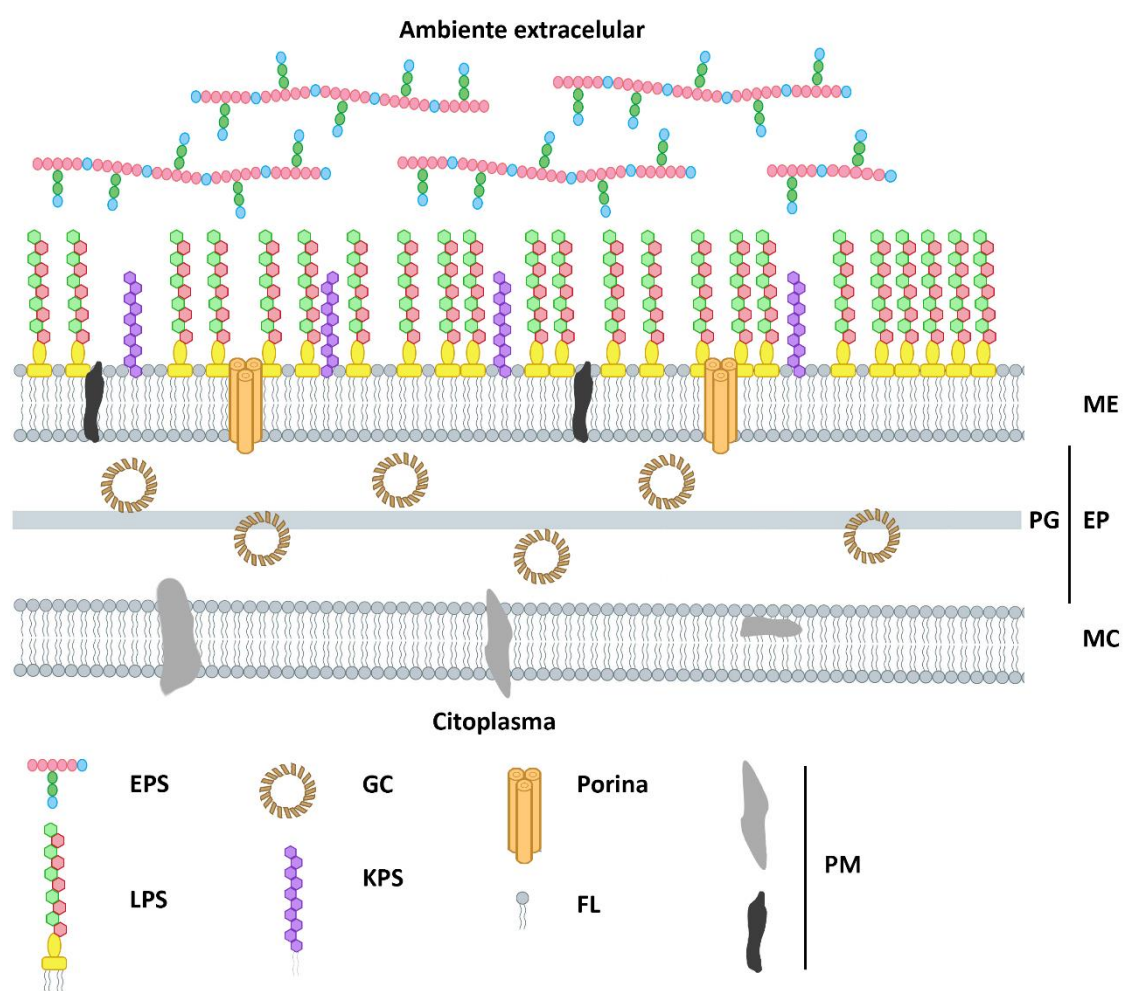


Figura 7. Esquema de la superficie rizobiana en la que se muestra la disposición de los polisacáridos superficiales. ME: Membrana externa; EP: Espacio periplásmico; PG: Capa de peptidoglicano; MC: Membrana citoplasmática; EPS: Exopolisacárido; GC: Glucanos cíclicos; LPS: Lipopolisacárido; KPS: Polisacárido capsular de tipo antígeno-K; FL: Fosfolípidos; PM: Proteínas de membrana.

7.1. Glucanos Cíclicos (GC)

Los glucanos cíclicos (GC) son estructuras cíclicas no ramificadas compuestas por 17-40 unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos β -(1,2). Dependiendo de la estirpe de rizobio, el número de residuos de glucosa varía (Spaink, 2000) y pueden aparecer sustituciones no aniónicas como fosfoglicerol, grupos succinilos y acetilos, y fosfocolina (Lepek y D'Antuono, 2005; Schue *et al.*, 2011). Los GC se localizan principalmente en el espacio periplásmico, pero también son secretados al exterior celular (Breedveld *et al.*, 1993; Breedveld y Miller, 1994). Los GC de *Bradyrhizobium* son diferentes a los de otros rizobios: estructuras macrocíclicas ramificadas que contienen residuos de glucosa unidas por enlaces glucosídicos β -(1,3) y β -(1,6) (Gibson *et al.*, 2008). En *S. meliloti*, los GC están compuestos por 20 residuos de glucosa unidos por enlaces glucosídicos β -(1,2) (Frayse *et al.*, 2003), mientras que los GC de *S. fredii* HH103 contienen entre 18-24 residuos de glucosa unidos por los mismos enlaces (Crespo-Rivas *et al.*, 2009) (**Figura 8**).

La producción de los glucanos cíclicos se lleva a cabo mediante dos proteínas codificadas por los genes *ndv* (de “*nodule development*” debido a la deficiencia provocada en el desarrollo nodular mostrada en los mutantes en estos genes) (López-Baena *et al.*, 2016). El gen *ndvB* (también denominado *cgs*, del inglés *cyclic glucan synthase*) codifica una glicosiltransferasa de 320,68 kDa, que es la responsable de la síntesis del polímero, mientras que el producto del gen *ndvA* es un transportador de tipo ABC (64,11 kDa) unido a la membrana interna de la superficie bacteriana. En el caso de *Bradyrhizobium*, además participa otra proteína, NdvC, en la síntesis del polímero (Gibson *et al.*, 2008).

Los GC juegan diferentes papeles importantes en los rizobios, como la adaptación a medios con baja concentración osmótica o la unión a la raíz (Frayse *et al.*, 2003), además de participar en el proceso de señalización en la nodulación (Ebel *et al.*, 1998; Bhagwat *et al.*, 1999) y en la modulación de la respuesta defensiva de la planta. Por ejemplo, en *Mesorhizobium loti*, los GC reprimen la producción de niveles altos de fitoalexinas antimicrobianas durante el proceso simbiótico con *Lotus japonicus* (D'Antuono *et al.*, 2008). Los GC de *B. japonicum* purificados son capaces de bloquear la respuesta defensiva de la planta en la simbiosis con *G. max* (Bhagwat *et al.*, 1999). Además, los GC tienen la habilidad de solubilizar los flavonoides y hacen la nodulación más efectiva (Frayse *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2009).

Quizás debido a sus posibles numerosas funciones tanto en vida libre como en la interacción simbiótica, los mutantes rizobianos defectivos en la producción de GC están afectados de modo muy negativo en simbiosis. Por ejemplo, la mutación de *ndvB* o *ndvA* en *S. meliloti* o *S. fredii* bloquea la simbiosis de forma que las plantas inoculadas con estos mutantes sólo dan lugar a la formación de nódulos pequeños, aberrantes y vacíos (pseudonódulos) (Dylan *et al.*, 1990; Bhagwat *et al.*, 1992; Catoira *et al.*, 2001). La ausencia de GC en *S. meliloti* provoca un fenotipo pleiotrópico, mostrando alteraciones en la superficie celular cuando crece en medios con baja osmolaridad, pérdida de motilidad al reducirse el número de flagelos, incremento de la resistencia a algunos bacteriófagos, aumento de la sensibilidad a algunos antibióticos y detergentes, incremento de la producción de EPS y se produce una alteración en las proteínas de la superficie celular (Breedvel y Miller, 1998; Arellano-Reynoso *et al.*, 2005; Muszyński *et al.*, 2011). En el caso del mutante *ndvB* en *S. fredii*, el fenotipo simbiótico es inefectivo de tal forma que se forman pseudonódulos en *G. max* y *Glycyrrhiza uralensis*, mientras que en *cowpie* (*V. unguiculata*), aunque se forman primordios nodulares estos no se desarrollan más allá, lo que conlleva una interrupción del proceso simbiótico de forma más temprana que en las otras plantas, probablemente debido a una pérdida de señalización temprana asociado a los GC (Crespo-Rivas *et al.*, 2009; Gay-Fraret *et al.*, 2012). En el caso de un mutante en *cgs* en *M. loti* MAFF303099, no se forman tubos de infección en *L. tenuis* (Kawaharada *et al.*, 2007 y 2008), lo que indica que esta bacteria requiere los GC para la infección de esta planta (D'Antuono *et al.*, 2005), además de mostrar una reducción significativa de la expresión de los genes del desarrollo nodular (D'Antuono *et al.*, 2008).

Los GC son importantes no sólo en la relación entre los rizobios y las leguminosas, sino también en las interacciones patógenas bacteria-eucariota (Jones *et al.*, 2007). Como ejemplo, mutantes carentes de GC de bacterias fitopatógenas como *Agrobacterium tumefaciens* o *Xanthomonas campestris* son incapaces de desarrollar enfermedades en las plantas que infectan (Breedveld y Miller 1994 y 1998; Rigano *et al.*, 2007), pero esta deficiencia también se puede trasladar a algunas bacterias patógenas de humanos como *Brucella abortus*, en la que la ausencia de producción de GC impide el desarrollo de la infección (Ugalde, 1999; Arellano-Reynoso *et al.*, 2005).

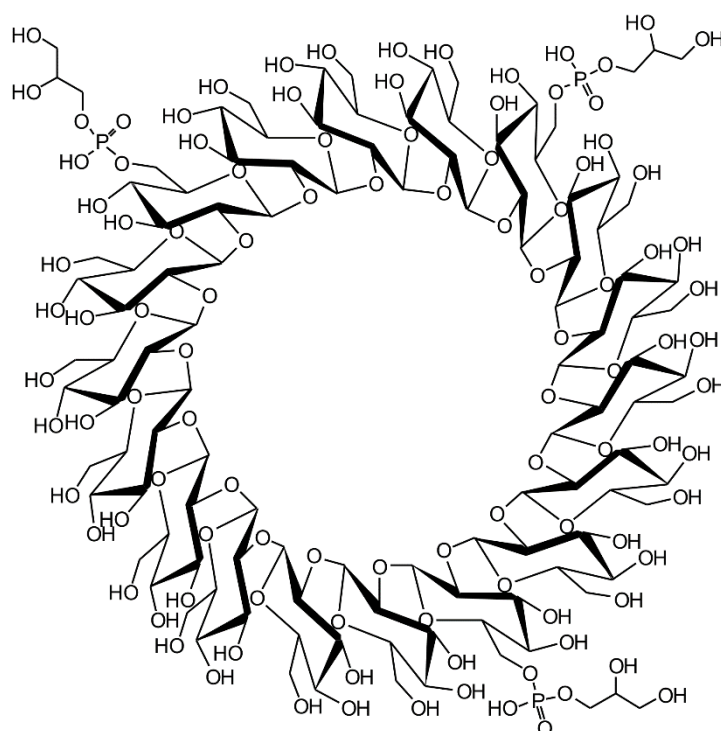


Figura 8. Estructura química de un GC compuesto de 18 residuos de glucosa de *S. fredii* HH103. Acosta-Jurado *et al.* (2016a).

7.2. Polisacárido capsular de tipo antígeno K (KPS)

Los polisacáridos capsulares (Antígenos-K o KPS, de *K-antigen polysaccharide*) se encuentran íntimamente asociados a la membrana externa de los rizobios (Kannenberg *et al.*, 1998; Pellock *et al.*, 2000; Haeze *et al.*, 2004; Fraysse *et al.*, 2005). Su nombre procede de su analogía estructural con un subgrupo de antígenos, denominados K, que se encuentran en *Escherichia coli*. Estos antígenos K son polisacáridos ácidos lineales, normalmente formado por repeticiones de unidades de un disacárido y cuyas, estructuras son específicas de estirpe (Reuhs *et al.*, 1993 y 1995; Le Quere *et al.*, 2006).

En el caso de los rizobios, los primeros KPS descritos se encontraron en especies de *S. meliloti* y *S. fredii* (Reuhs *et al.*, 1993 y 1998) aunque posteriormente han sido descritos en otros rizobios como *M. loti* y *R. tropici* (Townsend *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2013). En muchos rizobios, la subunidad estructural del KPS es un disacárido constituido por una molécula de Kdo (ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico) o un derivado estructural de éste (Kdx) y una hexosa neutra o un ácido urónico (Reuhs *et al.*, 1998; Fraysse *et al.*, 2003; Le Quere *et al.*, 2006; Downie, 2010). En el caso de *S. fredii* HH103, la estructura

del KPS no sigue este patrón común, sino que se trata de un homopolímero de unidades repetitivas de un derivado del ácido pseudoamínico (ácido 5-acetamido-3,5,7,9-tetradeoxi-7-(3-hidroxibutiramido)-L-*glicero*-L-*manno*-nonulosónico), el cual deriva del Kdo (Gil-Serrano *et al.*, 1999) (**Figura 9**).

En *S. meliloti* Rm41, el KPS recibe el nombre de K_{R5} y está compuesto por un disacárido compuesto por ácido glucurónico y un derivado del ácido pseudoamínico (Reuhs *et al.*, 1993; Kannenberg *et al.*, 1998). Para la producción de dicho KPS, esta cepa consta de tres regiones génicas diferenciadas: *rkp-1*, *rkp-2* y *rkp-3* (Kiss *et al.*, 2001). La región *rkp-1* contiene 10 genes (*rkpA-J*) que codifican proteínas involucradas en la exportación del KPS, de tal modo que participan en la síntesis y modificación del lípido transportador que interviene en la secreción del KPS (Kiss *et al.*, 1997). La región *rkp-2* está constituida por dos genes (*lpsL* y *rkpK*), uno de los cuales, *rkpK*, está implicado en la síntesis del ácido glucurónico (Kereszt *et al.*, 1998). La región *rkp-3* contiene 11 genes (*rkpL-Y*), algunos de cuyos productos participan en la exportación del polisacárido, mientras que otros son enzimas que sintetizan el derivado del ácido pseudoamínico presente en el KPS (Meinhardt *et al.*, 1993; Pálvölgyi *et al.*, 2009). Estas regiones también se encuentran en *S. fredii* HH103 y NGR234, aunque hasta el momento sólo se han estudiado las regiones *rkp-1* y *rkp-3* (Le Quere *et al.*, 2006; Parada *et al.*, 2006; Hidalgo *et al.*, 2010; Margaret *et al.*, 2012; Margaret-Oliver *et al.*, 2012).

El KPS confiere a los rizobios capacidades de protección frente a algunos factores de estrés y productos de defensa de la planta hospedadora, produce un incremento de la resistencia frente a bacteriófagos e incluso puede dar lugar a la unión de metales (Schue *et al.*, 2011).

En cuanto a la simbiosis parece ser una molécula activa que probablemente funcione como molécula señal en distintas fases de la simbiosis, afectando tanto a acontecimientos tempranos como el reconocimiento de la bacteria por la planta hospedadora, como más tardíos como infección e invasión (Frayse *et al.*, 2003).

En el caso de la simbiosis entre *S. meliloti* y *Medicago sativa* (alfalfa), el KPS y el EPS son simbióticamente equivalentes, de tal modo que mutantes afectados en EPS o en KPS inducen la formación de nódulos fijadores, pero la ausencia simultánea de ambos

polisacáridos conduce a un fenotipo inefectivo (Putnoky *et al.*, 1988; Pellock *et al.*, 2000). En *S. fredii* HH103, mutantes en la región *rkp-1*, incapaces de producir KPS, dan lugar a fenotipos deficientes en soja, *Cajanus cajan* y *Glycyrrhiza uralensis*, aunque en las tres plantas inducen la formación de un pequeño número de nódulos fijadores. El fenotipo de estos mutantes es independiente de la producción de EPS por lo que ambos polisacáridos no son funcionalmente equivalentes en esta bacteria (Hidalgo *et al.*, 2010; Margaret-Oliver *et al.*, 2012). Mutaciones en los genes correspondientes a la región *rkp-3* provocan deficiencias en la producción de KPS, pero también conllevan alteraciones en la producción de LPS, lo que genera fenotipos más severos en simbiosis, ya que se induce sólo la formación de pseudonódulos en plantas como soja, *V. unguiculata* y *Cajanus cajan*. Se cree que este hecho se debe fundamentalmente a alteraciones en la producción de LPS, más que a la ausencia de KPS (Margaret *et al.*, 2012).

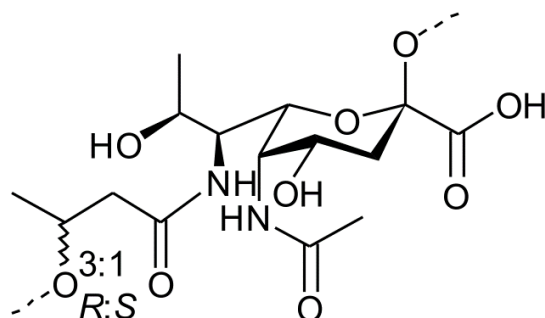


Figura 9. Estructura química de la unidad de repetición del KPS de *S. fredii* HH103 (ácido 5-acetamido-3,5,7,9-tetradexi-7-(3-hidroxibutiramido)-L-glicero-L-manno-nonulosónico). R: configuración R del ácido 3-hidroxibutírico; S: Configuración S del ácido 3-hidroxibutírico. Acosta-Jurado *et al.* (2016a).

7.3. Lipopolisacárido (LPS)

El LPS es uno de los principales componentes de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas (**Figura 7**). Está constituido por tres partes estructuralmente conservadas: el lípido A que actúa de anclaje a la membrana externa; el *core* o núcleo oligosacárido, y, en la mayoría de los casos, una cadena polisacárida-O (antígeno-O) que constituye la parte más externa de este polisacárido superficial (Campbell *et al.*, 2002; Fraysse *et al.*, 2003; Janczarek *et al.*, 2015; Choma *et al.*, 2017) (**Figura 10**). El LPS está situado en la hemimembrana externa de la membrana externa, lo que confiere a

esta membrana una alta asimetría e influye notablemente en su permeabilidad (Nikaido, 2003). Además de las partes que se pueden distinguir en la estructura del LPS, en los rizobios se pueden diferenciar dos tipos de LPS, el LPS rugoso o lipooligosacárido, fracción que contienen el lípido A y el *core* y el LPS liso, que contiene los tres dominios del LPS (lípido A, *core* y antígeno-O) (Frayssé *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2005; Muszyński *et al.*, 2011).

El lípido A es la parte lipofílica del LPS que lo ancla a la membrana externa a través de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (Raetz *et al.*, 2007) y en los rizobios su estructura puede diferir de unas especies a otras en función de los componentes glicosídicos que lo componen y del patrón de acilación (Que *et al.*, 2000). La estructura del lípido A es conocida en muchas especies de rizobios como *R. etli* CE3 (Kannenberg *et al.*, 1998), *S. meliloti* 1021 (Ferguson *et al.*, 2005 y 2006), *S. fredii* NGR234 (Gudlavalleti y Fosberg, 2003), diversas especies de *Bradyrhizobium* (Komaniecka *et al.*, 2014; Silipo *et al.*, 2014), rizobios nodulantes de tallos como *Azorhizobium caulinodans* (Noel *et al.*, 1984; Choma *et al.*, 2012) y fitopatógenos como *Agrobacterium tumefaciens* C58 (Silipo *et al.*, 2004). En el caso del género *Sinorhizobium* el lípido A está constituido por un disacárido de glucosamina acilado y fosforilado en las posiciones 1' y 4', al igual que en la mayoría de las enterobacterias, (Noel y Duelli, 2000), al cual se unen cuatro ácidos grasos de cadena larga (Lepek y D'Antuono, 2005).

El lípido A se une al *core* a través del Kdo mediante enlaces débiles o lábiles. Esta estructura comparte características comunes entre *R. leguminosarum* y *Sinorhizobium* aunque pueden existir pequeñas variaciones (Frayssé *et al.*, 2003).

El antígeno-O es un heteropolisacárido constituido por la repetición de un oligosacárido que puede contener ácidos urónicos, heptosas o Kdo. Su composición varía en los diferentes rizobios, incluso dentro de la misma especie, excepto en las estirpes de *Sinorhizobium* analizadas, las cuales tienen LPS estructuralmente conservados y supone la región antigénica dominante (Reuhs *et al.*, 1995 Noel y Duelli, 2000; Frayssé *et al.*, 2003; Fridrich y Whitfield, 2012; Janczarek *et al.*, 2015).

En *S. fredii* HH103 aún no se ha determinado la estructura del LPS, aunque se sabe que contiene unidades de Kdo, glucosa, ácido glucurónico y galacturónico y algún ácido

nonulosónico (Miguel Ángel Rodríguez Carvajal, comunicación personal), siendo este último también componente del KPS.

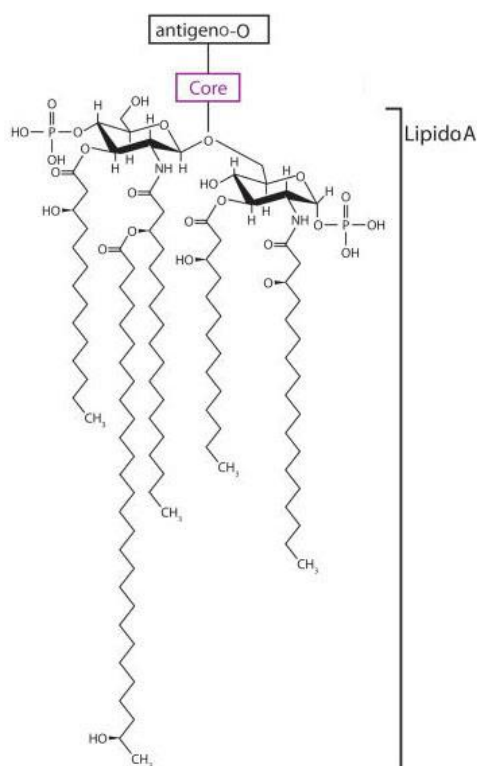


Figura 10. Representación esquemática de la estructura química del LPS de *S. meliloti*. Figura adaptada de Gibson *et al.* (2008).

Existe una gran cantidad de genes involucrados en la biosíntesis del LPS localizados en diferentes partes del genoma bacteriano. En las diferentes especies de rizobios se pueden encontrar genes involucrados en la biosíntesis del lípido A, denominados comúnmente *lpx*, además de los genes *fabZ*, *F2F1*, *msbB* y *acpXL* (Price *et al.*, 1994; Finan *et al.*, 2001; Haag *et al.*, 2009; Vanderlinde *et al.*, 2009; Ardisson *et al.*, 2011) y genes para la biosíntesis del *core* denominados *lpsB*, *lpsCDE*, *lpsL*, *kdsAB* y *kdtA* (Kadrmaz *et al.*, 1998; Lagares *et al.*, 2001; Capela *et al.*, 2001).

El LPS no es una estructura estática, puede ser modificado por varias vías debido a condiciones de estrés (bajo pH, baja concentración de oxígeno, antocianinas) (Duelli *et al.*, 2001; Kannenberg y Carlson, 2001; Reuhs *et al.*, 2005) o, como ocurre en *S. fredii* NGR234, los flavonoides pueden inducir cambios en el antígeno-O en paralelo con la expresión de los genes de nodulación (Theunis *et al.*, 2004; Broughton *et al.*, 2006).

Incluso, también se puede dar un aumento en la hidrofobicidad del LPS durante la diferenciación de la bacteria desde el estado de vida libre a estado de bacteroide, lo que le permite adoptar un grado de interacción óptima con la superficie de las células vegetales (Kannenbergh y Carlson, 2001; Fraysse *et al.*, 2003; D'Haeze *et al.*, 2007).

El LPS desempeña importantes funciones en los rizobios. Así, mutaciones que alteran su producción afectan a la superficie bacteriana sensibilizando la membrana contra detergentes, estreses ambientales, respuestas defensivas del hospedador como las especies reactivas del oxígeno (ROS; del inglés *Reactive Oxygen Species*) y péptidos antimicrobianos, sensibilidad a fagos y, además, generan una morfología rugosa de las colonias (Albus *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 2003; Scheidle *et al.*, 2005).

A diferencia de lo que ocurre con el EPS (que interviene en fases tempranas de la simbiosis), se ha postulado que el LPS lleva a cabo diversas funciones en distintas fases de la simbiosis, incluyendo las tardías (Becker *et al.*, 2005). Este polisacárido es importante en la supresión de la respuesta defensiva de la planta, interviene como señal durante la formación del simbiosoma y contribuye a la adaptación de las condiciones endosimbióticas dentro del nódulo (Fraysse *et al.*, 2003; Brewin, 2004; Mathis *et al.*, 2005). Además, puede modular el desarrollo de los tubos de infección a través de los pelos radicales (Dazzo *et al.*, 1995).

Por este motivo, algunos mutantes rizobianos afectados en el LPS son defectivos en simbiosis, aunque estos defectos son más graves en algunas simbiosis que en otras (Niehaus *et al.*, 1998; Lerouge y Varderleyden, 2002; Campbell *et al.*, 2003; D'Haeze *et al.*, 2004; Beck *et al.*, 2008). Más concretamente, alteraciones en el lípido A puede hacer que el LPS pierda su capacidad protectora frente a la respuesta inmune innata del hospedador (Raetz *et al.*, 2007), lo que puede dar lugar a retrasos en la nodulación, formación anormal del bacteroide, como ocurre en la simbiosis de *R. leguminosarum* bv. *viceae* con *Pisum sativum* (guisante), y, además, alterar la producción de óxido nítrico (NO) en las raíces del hospedador, como se ha descrito en la interacción de *M. loti* con *L. japonicus* (Vedam *et al.*, 2004; Muszyński *et al.*, 2011; Hashimoto *et al.*, 2012). Mutaciones en el gen *lpsB* en especies de *Sinorhizobium* dan lugar a un *core* con modificaciones en la composición de azúcares. Estos mutantes, en su interacción con *Medicago*, son capaces de llevar a cabo el proceso simbiótico hasta la diferenciación del

bacterioide, donde el programa no se completa y no se lleva a cabo la fijación de nitrógeno (Campbell *et al.*, 2002). En *S. fredii* HH103, los mutantes en los genes *lpsB*, *lpsE* y *greA* están muy afectados en su interacción con soja, donde inducen numerosos pseudonódulos y un reducido número de nódulos con morfología externa aparentemente normal pero que muestran síntomas de senescencia temprana (Margaret *et al.*, 2013). Por último, la completa ausencia o alteraciones en el antígeno-O puede causar defectos en el proceso de infección o la incapacidad de la fijación de nitrógeno molecular en las parejas simbióticas *R. leguminosarum* y *S. meliloti* con *P. sativum* y *M. sativa*, respectivamente (Lerouge y Vardeleyden, 2002; Fraysse *et al.*, 2005; Forsberg y Carlson, 2008).

7.4. Exopolisacárido (EPS)

Los EPS son polisacáridos extracelulares que se producen en grandes cantidades y se secretan al exterior celular. Pueden estar débilmente asociados a la superficie celular o dicha unión puede ser nula (Becker *et al.*, 1998; Fraysse *et al.*, 2003; Skorupska *et al.*, 2006). Son homo- o heteropolímeros ácidos que suelen ser específicos de especie o de estirpe y están constituidos por unidades de repetición compuestas principalmente por monosacáridos comunes como D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, L-ramnosa, y ácidos D-glucurónico y D-galacturónico (**Figura 11**). Además, estas unidades pueden estar decoradas con sustituciones de tipo acetilo, piruvilo, succinilo y metilo (Becker *et al.*, 1998; Skorupska *et al.*, 2006; Downie, 2010; Janczarek, 2011).

La mayoría de los EPS de los rizobios de crecimiento rápido suelen estar compuestos por entre ocho y nueve azúcares como ocurre en las especies de *S. meliloti*, *S. fredii*, *R. leguminosarum* y *R. tropici*. El EPS puede producirse de dos formas diferentes, una de bajo peso molecular (LMW; del inglés, Low Molecular Weight) constituida por monómeros, dímeros y trímeros de las subunidades de repetición, y una de alto peso molecular (HMW, High Molecular Weight) constituidos por polímeros de hasta 10^6 - 10^7 Da (Fraysse *et al.*, 2003; Janczarek *et al.*, 2011). En el caso de los rizobios de crecimiento lento, las estructuras del EPS son muy diversas como por ejemplo en las especies de *B. japonicum* y *Bradyrhizobium elkanii*, compuestos por repeticiones de un pentasacárido (Minamisawa, 1989; Poveda *et al.*, 1997) y un tetrasacárido respectivamente (An *et al.*, 1995).

S. meliloti produce dos tipos de EPS, el succinoglucano (EPS I) y el galactoglucano (EPS II), éste último sintetizado bajo condiciones limitantes de fosfato (Zhan *et al.*, 1991; Reinhold *et al.*, 1994; Zevenhuizen *et al.*, 1997). El succinoglucano está constituido por unidades de repetición que contienen siete residuos de D-glucosa y un residuo de D-galactosa unidos por enlaces β -glucosídicos y con sustituciones de tipo acetilo, piruvilo y succinilo (Reuber *et al.*, 1993; Reinhold *et al.*, 1994; Zevenhuizen *et al.*, 1997) (**Figura 11**). El galactoglucano está constituido por un disacárido compuesto por residuos de D-glucosa y D-galactosa unidos por enlaces α y β y con sustituciones de tipo acetilo y piruvilo (Her *et al.*, 1990; Reuber *et al.*, 1993; Zevenhuizen *et al.*, 1997) (**Figura 11**). En el caso de las estirpes de *R. leguminosarum*, el EPS producido consta de una estructura básica, aunque puede variar en cuanto a las modificaciones de tipo no-carbohidratos. Su estructura está compuesta por unidades de repetición que contienen D-glucosa, D-ácido glucurónico y D-galactosa, además de modificaciones de tipo acetilo y piruvilo, y grupos 3-hidroxibutanoil (Robertson *et al.*, 1981; McNeil *et al.*, 1986; Philip-Hollingsworth *et al.*, 1989; O'Neill *et al.*, 1991; Breedveld *et al.*, 1993).

Los EPS de *S. fredii* HH103 y NGR234 presentan la misma estructura (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014). Su unidad de repetición está compuesta de cinco residuos de D-glucosa, dos residuos de D-galactosa y dos unidades de D-ácido glucurónico; además hay sustituciones de grupos piruvilo y acetilo (**Figura 11**).

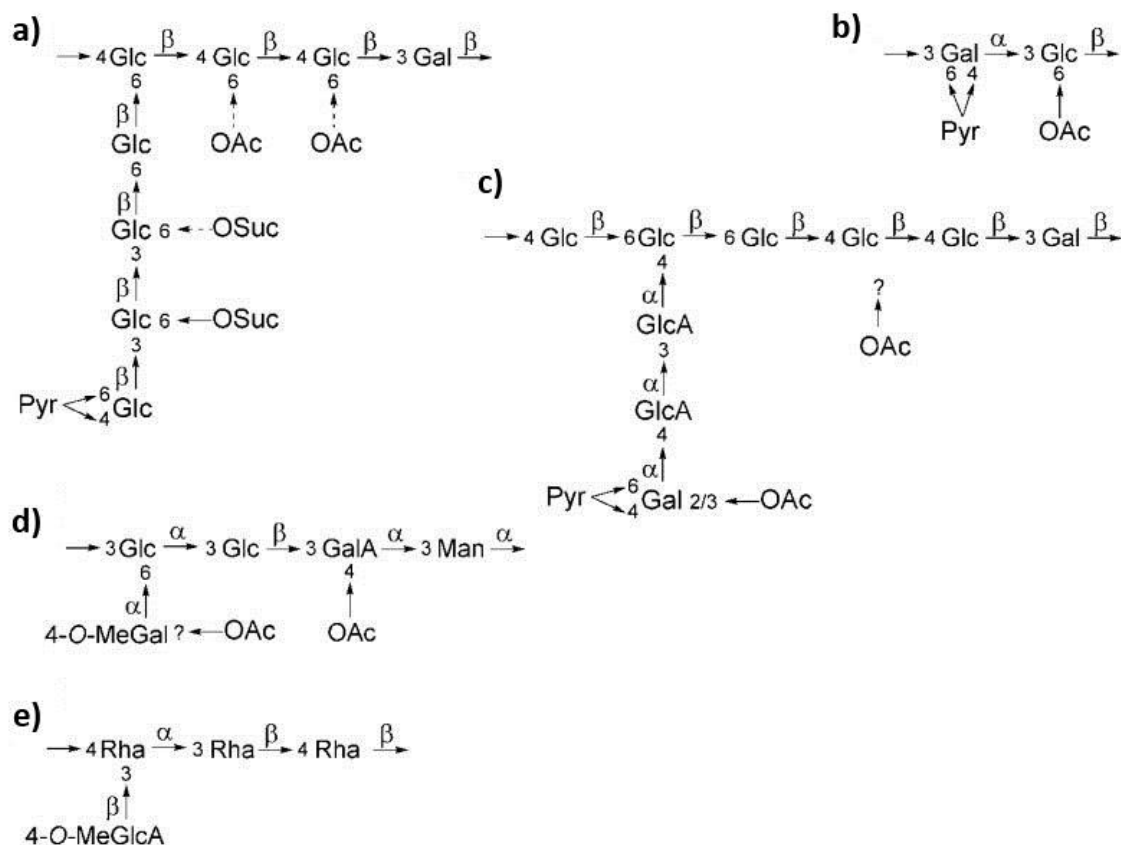


Figura 11. Estructura química de los EPS producidos por diferentes especies de *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium*. **a)** EPS I y **b)** EPS II de *S. meliloti* 1021; **c)** EPS de *S. fredii* HH103 y NGR234; **d)** EPS de *B. japonicum* USDA110; **e)** EPS/NPS de *B. elkanii* USDA61. Figura adaptada de López-Baena *et al.* (2016).

El EPS lleva a cabo varias funciones importantes para la bacteria: captación de nutrientes del medio, protección frente a estreses ambientales como la desecación y frente a agentes antimicrobianos, y, además, interviene en la unión a superficies abióticas y a raíces de las plantas hospedadoras. El EPS también es el principal componente de la matriz de biopelículas (*biofilms*), por lo que resulta indispensable para su correcta formación (Frayssé *et al.*, 2003; Downie, 2010; Rinaudi y Giordano, 2010; Janczarek, 2011). Asimismo, este polisacárido protege a la bacteria frente a ROS durante la infección de la planta (D’Haeze *et al.*, 2004) y parece ser que es capaz de suprimir la respuesta defensiva de la planta (Jones *et al.*, 2008).

La biosíntesis del EPS es un proceso complejo regulado tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional e influenciado por varios tipos de nutrientes, condiciones ambientales y flavonoides. Todos estos factores pueden afectar tanto al nivel de síntesis

como a posibles modificaciones (Dunn *et al.*, 1992; Cooper, 2007; Janczarek y Skorupska, 2011). El proceso de biosíntesis requiere la actividad coordinada de un complejo multiproteico localizado tanto en la membrana interna como en la externa (Janczarek, 2011), y consta de varias etapas (Becker, 2015):

- i) Síntesis de los precursores nucleótido-azúcares.
- ii) Síntesis de las unidades de repetición oligosacarídicas o síntesis directa del polisacárido por sucesiva o progresiva actividad de las glicosiltransferasas.
- iii) Ensamblaje del polisacárido a partir de las unidades de repetición.
- iv) Exportación del producto sintetizado.

La regulación de la producción de este polisacárido se ha estudiado principalmente en dos especies: *S. meliloti* y *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Becker *et al.*, 1998; Janczarek, 2011). Normalmente, los genes involucrados en la síntesis del EPS se encuentran agrupados en grandes regiones génicas o *clusters* en el genoma bacteriano, ya sea en el cromosoma o en los megaplásmidos de los rizobios (Finan *et al.*, 2001; Kaneko *et al.*, 2000 y 2002; González *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2006; Król *et al.*, 2007; Reeve *et al.*, 2010a, b).

En *S. meliloti* los genes que intervienen en la síntesis de EPS I forman un gran *cluster* *exo/exs* (~35 Kb) localizado en el megaplásmido pSymB (Becker *et al.*, 1993a, b; Glucksmann *et al.*, 1993a, b; Müller *et al.*, 1993; Reuber y Walker, 1993; Finan *et al.*, 2001). Esta región consta de 28 genes *exo/exs* organizados en varios operones entre los que se encuentran los genes que codifican enzimas para la síntesis de los precursores nucleótido-azúcares (*exoB* y *exoN*), enzimas involucradas en la unidad de ensamblaje (*exoY*, *exoF*, *exoA*, *exoL*, *exoM*, *exoO*, *exoU*, *exoW*), en las modificaciones o decoraciones (*exoZ*, *exoH* y *exoV*) y proteínas responsables de la polimerización de las unidades de repetición y transporte de las moléculas de EPS I (*exoP*, *exoT*, *exoQ* y *exsA*) (Becker *et al.*, 1993a, b; Glucksmann *et al.*, 1993a, b; Müller *et al.*, 1993; Reuber y Walker, 1993; Becker *et al.*, 1995a, b; Finan *et al.*, 2001; Jofre y Becker, 2009). Además de los genes organizados en este *cluster*, existen otros genes involucrados en la síntesis de los precursores de los azúcares (*exuC*) y regulación del proceso de síntesis del mismo (*exoD*, *exoR*, *exoS* y *mucR*) que se encuentran dispersos por el genoma de la bacteria (Doherty

et al., 1988; Reed *et al.*, 1991; Uttaro *et al.*, 1990; Reed y Walker, 1991; Keller *et al.*, 1995).

La fracción LMW del EPS I se genera por la escisión o fraccionamiento de la fracción HMW por acción de las glicanasas ExoK y ExsH, cuya función de escisión es susceptible de cambios producidos en las modificaciones de tipo acetilo y succinilo del EPS I de HMW (York y Walker, 1998).

Para la síntesis del EPS II se requiere la acción de otro *cluster* de aproximadamente 27 Kb compuesto por los genes *exp*, localizados en el plásmido pSymB a una distancia de 160 Kb del *cluster* *exo/exs* (Becker *et al.*, 1997; Moreira *et al.*, 2000).

En *R. leguminosarum*, sólo existe un tipo de EPS y su biosíntesis se lleva a cabo a través de un gran *cluster* denominado Pss-I (Król *et al.*, 2007) de ~35 Kb y que comprende más de 20 genes conservados en casi todas las estirpes de *R. leguminosarum* (Sadykov *et al.*, 1998; González *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2006; Król *et al.*, 2007; Reeve *et al.*, 2010a y b).

S. fredii NGR234 y HH103 poseen una región de 28 Kb que contiene los genes *exo* organizados en cuatro operones (Gray *et al.*, 1990; Zhan y Leigh, 1990). Existen grandes regiones en este *cluster* que están muy relacionadas con zonas génicas de la región *exo/exs* del EPS I de *S. meliloti*, lo que explica la similitud estructural entre sus EPS. Sin embargo, existen algunas diferencias como la ausencia del gen *exoH* en *S. fredii*, lo que provoca que el EPS no posea decoraciones de tipo succinilo (Staehelin *et al.*, 2006; Schmeisser *et al.*, 2009; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014).

En cuanto a la regulación del proceso de síntesis se han identificado varios genes reguladores, la mayoría de ellos represores, localizados tanto en el cromosoma (*mucR*, *exoR*, *exoS*, *exoD*, *expR*, *syrM* y *phoB*) como en el megaplásmido pSymB de *S. meliloti* (*exsB*, *exoX* y *wggR*). Entre estos reguladores se encuentra MucR, el cual parece ser un regulador global que juega un doble papel en *S. meliloti*: actúa en la regulación positiva de la síntesis del EPS I y negativa para la síntesis del EPS II (Bertram-Drogatz *et al.*, 1997 y 1998; Rüberg *et al.*, 1999; Bahlawane *et al.*, 2008).

Durante el proceso simbiótico, en algunas interacciones el EPS parece ser indispensable para que la infección de las raíces de la planta hospedadora se lleve a cabo de forma correcta, sobre todo en las primeras etapas (Skorupska *et al.*, 2006). El papel del EPS en

la simbiosis con leguminosas de tipo indeterminado parece ser mucho más importante que con las de tipo determinado (Frayse *et al.*, 2003). Por ejemplo, mutantes de *S. meliloti* o *R. leguminosarum* deficientes en la producción de EPS presentan un fenotipo en los que no se desarrollan tubos de infección o dan lugar a tubos de infección aberrantes (mutantes en *exoY* o *exoH*), por lo que son incapaces de invadir las células del nódulo y, por lo tanto, no tiene lugar la fijación de nitrógeno (Rolfe *et al.*, 1996; van Workum *et al.*, 1997; Cheng y Walker *et al.*, 1998). Sin embargo, la situación es diferente en estirpes de *S. meliloti* capaces de producir un KPS simbióticamente activo, como Rm41. Un mutante *exoB* de esta estirpe, carente de EPS, es capaz de inducir nódulos fijadores en alfalfa debido a que su KPS es capaz de sustituir funcionalmente al EPS (Williams *et al.*, 1990; Reuhs *et al.*, 1995). Se ha postulado que la fracción LMW del EPS I es la forma biológicamente activa en *S. meliloti*, de tal forma que actúa como señal simbiótica (Frayse *et al.*, 2003). Sin embargo, recientemente se ha descubierto que no es estrictamente necesaria para llevar a cabo la simbiosis y la subsiguiente fijación de nitrógeno, sino que con la fracción HMW del EPS I sería suficiente (Hajeewaka *et al.*, 2016).

En el caso de HH103, un mutante deficiente en la producción de EPS (mutante *exoA*) es capaz de nodular en plantas tanto de tipo determinado como indeterminado, incluso un doble mutante en KPS y EPS sigue siendo efectivo en ambos tipos de plantas (Margaret-Oliver *et al.*, 2012). Además, en HH103 la ausencia de EPS, no sólo no afecta a la nodulación en soja, sino que incrementa la capacidad competitiva de la bacteria para nodular en soja, aunque la disminuye en *V. unguiculata* (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014). Por lo tanto, las alteraciones producidas en los diferentes polisacáridos y su efecto sobre la simbiosis, parece depender más de la pareja simbiótica en sí, que del tipo de nódulo que forme la planta hospedadora.

La ausencia del EPS puede dar lugar a una simbiosis efectiva como ocurre en *S. fredii* HH103 con soja o *M. loti* R7A con *L. japonicus*. Sin embargo, alteraciones estructurales en el EPS puede dar lugar a deficiencias severas en el proceso simbiótico en el caso de la interacción de *M. loti* R7A con *L. japonicus* (Kelly *et al.*, 2013). Este fenómeno se produce debido a la presencia de un receptor de tipo quinasa (EPR3) que es capaz de reconocer y unir el EPS directamente, de forma que es capaz de discernir los EPS

compatibles e incompatibles con la planta y permitir así o no, el desarrollo de la simbiosis (Kawaharada *et al.*, 2015 y 2017) (**Figura 12**).

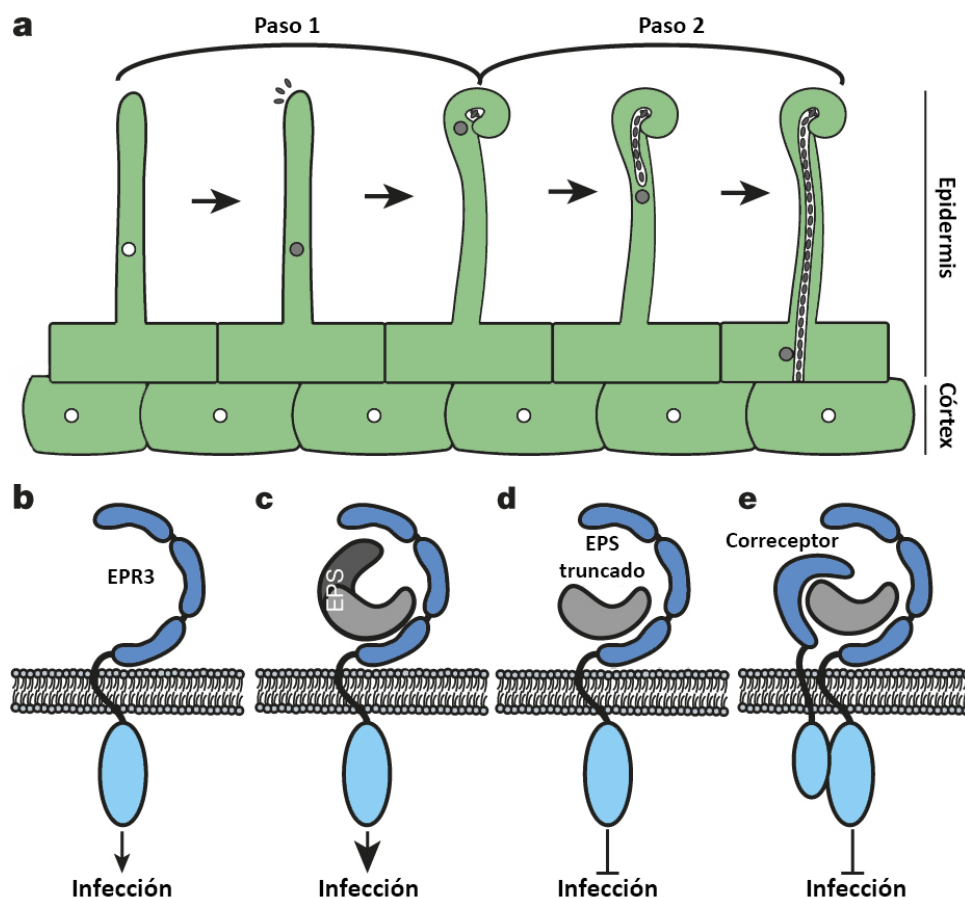


Figura 12. Modelo de reconocimiento de rizobios compatibles mediante un proceso de dos pasos a través del receptor EPR3. **a)** Paso 1: colonización e iniciación de la infección específica de hospedador iniciada por la unión de NF a los receptores NFR1 y NFR5, lo que permite la expresión del gen *Epr3* en las células epidérmicas (círculos grises) y la curvatura del pelo radical encerrando al rizobio. Paso 2: La señalización por NFR1 y NFR5 continua y EPR3 percibe al EPS. **b-e)** resultado de la percepción de EPR3 del EPS compatible y truncado. **b)** el nivel básico de señalización de EPR3 promueve la infección. **c)** la percepción de EPS compatible incrementa la señalización y promueve una infección persistente. **d)** un EPS truncado activa la vía que bloquea la infección. **e)** alternativamente un mecanismo mediado por un correceptor puede bloquear la infección. Figura adaptada de Kawaharada *et al.* (2015).

7.4.1. El regulador transcripcional MucR

MucR es una proteína de unos 15,7 kDa perteneciente a la familia de reguladores transcripcionales Ros/MucR caracterizados por la presencia de un motivo de tipo “dedos de zinc” (de *zinc-fingers*) Cys₂-His₂ (Keller *et al.*, 1995). Este regulador se encuentra ampliamente distribuido en diversas proteobacterias como por ejemplo en *A. tumefaciens*, en el cual fue descrito el primer regulador de tipo “dedos de zinc” en procariotas: Ros, un ortólogo de MucR (Chou *et al.*, 1985). Para su función, MucR se une

a secuencias palindrómicas, denominadas Ros/MucR *boxes*, que se localizan en regiones situadas aguas arriba de los genes diana (D'Souza-Ault *et al.*, 1993; Bertram-Drogatz *et al.*, 1997; Janczarek y Skorupska, 2007).

En las bacterias en las que se encuentra, MucR/Ros regula diversos procesos y funciones como la biosíntesis del EPS en *R. leguminosarum* (Janczarek y Skorupska, 2007), *S. meliloti* (Keller *et al.*, 1995) y *A. radiobacter* (Tiburtius *et al.*, 1996), la transición de la fase S a G1 en el ciclo celular de *Caulobacter* (Fumeaux *et al.*, 2014), la producción de alginato en *Pseudomonas aeruginosa* (Wang *et al.*, 2015) o la expresión de los genes de virulencia, *virC* y *virD*, y un oncogen de plantas, *ipt*, localizados en el plásmido Ti en *A. tumefaciens* (Close *et al.*, 1985; Cooley *et al.*, 1991; Chou *et al.*, 1998). Además, MucR está presente en bacterias patógenas de animales como en *Brucella*, donde este regulador es importante para la virulencia de la bacteria (Caswell *et al.*, 2013) o para regular la expresión de los genes de *quorum sensing* y sistema de secreción de tipo IV (Dong *et al.*, 2013). En *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, RosR regula gran cantidad de procesos como la síntesis de componentes de la superficie celular (entre los que se encuentran los polisacáridos), movilidad y metabolismo bacteriano (Rachwal *et al.*, 2015). En cuanto a su implicación en simbiosis, la inactivación de *rosR* da lugar a una simbiosis inefectiva con trébol (Janczarek *et al.*, 2010), al igual que ocurre en la simbiosis de *S. fredii* CCBAU45436 con *G. max* JD17, donde MucR1 es esencial para el desarrollo de nódulos fijadores de nitrógeno (Jiao *et al.*, 2016).

OBJETIVOS

El grupo de investigación en cuyo seno se han realizado los estudios contenidos en esta Tesis lleva más de 30 años trabajando en la simbiosis rizobio-leguminosa, más concretamente en la interacción de *Sinorhizobium fredii* HH103 con diversas leguminosas hospedadoras. En los últimos años las investigaciones de este grupo se han centrado en el estudio del papel simbiótico de diversos polisacáridos superficiales presentes en esta bacteria. En esta Tesis se ha pretendido profundizar en diversos aspectos relacionados con este objetivo general del grupo. Los objetivos concretos de esta Tesis son:

1. Caracterizar la región *rkp-2* de *S. fredii* HH103 y estudiar su implicación en la producción de diferentes polisacáridos superficiales de esta bacteria.
2. Estudiar la importancia de los diferentes polisacáridos superficiales de *S. fredii* HH103 en la simbiosis con la leguminosa modelo *Lotus*.
3. Estudiar la regulación de la producción del EPS de *S. fredii* HH103 mediada por flavonoides.
4. Caracterizar los genes *mucR1* y *mucR2* de *S. fredii* HH103 y estudiar sus posibles efectos reguladores sobre genes involucrados en la producción de EPS.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material y Métodos relacionados con bacterias

1.1. Bacterias, plásmidos y agentes selectivos e identificativos

1.1.1. Bacterias y plásmidos

Las estirpes bacterianas y plásmidos utilizados en esta Tesis se recogen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Bacterias y plásmidos utilizados en esta Tesis.

<i>Sinorhizobium fredii</i> HH103 y derivados		
Estirpe	Características relevantes	Referencia
SVQ269	Derivado Rif ^R de HH103 (estirpe silvestre),	Madinabeitia <i>et al.</i> , 2002
SVQ116	SVQ269 <i>nodA::Tn5-B20</i> , Rif ^R Km ^R Nm ^R	Buendía-Clavería <i>et al.</i> , 2003
SVQ502	SVQ269 <i>nodD1::lacZΔp-Gm^R</i> , Rif ^R Gm ^R	Vinardell <i>et al.</i> , 2004b
SVQ530	SVQ269 <i>exoA::lacZΔp-Gm^R</i> , Rif ^R Gm ^R	Parada <i>et al.</i> , 2006
SVQ535	SVQ269 <i>rkpH::lacZΔp-Gm^R exoA::Ω</i> , Rif ^R Gm ^R Sp ^R	Parada <i>et al.</i> , 2006
SVQ536	SVQ269 <i>rkpA::lacZΔp-Gm^R</i> , Rif ^R Gm ^R	Margaret-Oliver <i>et al.</i> , 2012
SVQ548	SVQ269 <i>nodR::lacZΔp-Gm^R</i> , Rif ^R Gm ^R	Esta Tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2016b
SVQ554	SVQ269 <i>nodD2::lacZ-Gm^R</i> , Rif ^R Gm ^R	Esta Tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2016b
SVQ562	SVQ269 <i>ndvB::lacZΔp-Gm^R</i> , Rif ^R Gm ^R	Crespo-Rivas <i>et al.</i> , 2009
SVQ575	SVQ269 <i>rkpU::Ω</i> ; Rif ^R Sp ^R	Hidalgo <i>et al.</i> , 2010
SVQ582	SVQ269 <i>rkpM::lacZΔp-Gm^R</i> , Rif ^R Gm ^R	Margaret <i>et al.</i> , 2012

SVQ592	SVQ269 <i>rkpQ</i> :: Ω , Rif ^R Sp ^R	Margaret <i>et al.</i> , 2012
SVQ594	SVQ269 <i>rkpQ</i> :: <i>lacZ</i> Δ p-Gm ^R , Rif ^R Gm ^R	Margaret <i>et al.</i> , 2012
SVQ613	SVQ269 <i>lpsB</i> :: Ω , Rif ^R Spc ^R	Margaret <i>et al.</i> , 2013
SVQ642	SVQ269 <i>lpsE</i> :: <i>lacZ</i> Δ p-Gm ^R , Rif ^R Gm ^R	Margaret <i>et al.</i> , 2013
SVQ667	SVQ269 <i>rkpP</i> :: <i>lacZ</i> Δ p-Gm ^R , Rif ^R Gm ^R	Margaret <i>et al.</i> , 2012
SVQ703	SVQ269 <i>rkpK</i> :: <i>lacZ</i> Δ p-Gm ^R , Rif ^R Gm ^R	Esta tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2017
SVQ703C	SVQ703 complementado en <i>cis</i> por introducción de pMUS1401, derivado de pK18 <i>mob</i> que porta una copia silvestre del gen <i>rkpK</i> , Rif ^R Gm ^R Km ^R	Esta tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2017
SVQ705	SVQ269 con los genes <i>flaCBAD</i> delecionados, Rif ^R	Esta Tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2016a
SVQ706	SVQ269 con el gen <i>mucR1</i> delecionado (Δ <i>mucR1</i>), Rif ^R	Esta Tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2016c
SVQ706C	SVQ706 complementado en <i>cis</i> por introducción de pMUS1175, derivado de pK18 <i>mob</i> que porta un fragmento de ~1,7-kb que contiene el gen <i>mucR1</i> , Rif ^R Km ^R	Esta Tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2016c
SVQ719	SVQ269 <i>mucR2</i> :: <i>lacZ</i> Δ p-Gm ^R , Rif ^R Gm ^R	Esta Tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2016c
SVQ720	SVQ269 Δ <i>mucR1</i> ; <i>mucR2</i> :: <i>lacZ</i> Δ p-Gm ^R , Rif ^R Gm ^R	Esta Tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2016c
SVQ721	SVQ269 <i>mucR1</i> :: <i>lacZ</i> Δ p-Gm ^R , Rif ^R Gm ^R	Esta Tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2016c
SVQ763	SVQ269 <i>lpsL</i> :: <i>lacZ</i> Δ p-Gm ^R , Rif ^R Gm ^R	Esta tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2017
SVQ763C	SVQ763 complementado en <i>cis</i> por introducción de pMUS1345, derivado de	Esta tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2017

pK18*mob* que porta una copia silvestre del
gen *lpsL*, Rif^R Gm^R Km^R

Otros rizobios

Estirpe	Características relevantes	Referencia
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	Estirpe de referencia	Maekawa <i>et al.</i> , 2009
<i>Mesorhizobium loti</i> NZP2235	Estirpe de referencia	Jarvis <i>et al.</i> , 1982
<i>S. meliloti</i> 1021	Estirpe de referencia	Meade y Signer, 1977
<i>S. fredii</i> NGR234	Estirpe de referencia	Trinick, 1980
<i>S. fredii</i> USDA257	Estirpe de referencia	Keyser <i>et al.</i> , 1982

Escherichia coli

Estirpe	Características relevantes	Referencia
DH5α	<i>SupE44, ΔlacU169, 5hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1, Nal^R</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
803	Gal ⁻ , Met ⁻ , Hfr r _k m _k	Wood, 1966
BL21	<i>fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS</i>	Studier y Moffatt, 1986

Plásmidos

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pAB2001	Plásmido que contiene el casete <i>lacZ</i> Δp-Gm ^R , Gm ^R	Becker <i>et al.</i> , 1995c
pBBR1MCS-5	Vector de clonación de amplio rango de hospedador, Gm ^R	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pBluescript II SK (+/-) phagemid	Vector de clonación, Ap ^R	Stratagene (EEUU)
pGEM-T Easy	Vector de clonación de productos de PCR, Ap ^R	Promega (EEUU)
pGEX-KG	Vector de expresión en bacterias de genes fusionados al gen <i>gst</i> , Ap ^R	Amersham (Reino Unido)
pK18mob	Vector de clonación (suicida en los rizobios), Km ^R	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pK18mobsac	Vector de clonación que contiene el gen de sensibilidad a la sacarosa. Suicida en los rizobios, Km ^R	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pPHU231	Vector de clonación para análisis de expresión de promotores por fusión en fase con GFP	McIntosh <i>et al.</i> , 2008
pRK2013	Plásmido coadyuvante, Km ^R	Figurski y Helinski, 1979

Construcciones que portan el gen *lpsL*

pMUS1345	Plásmido pK18mob que porta un fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III de ~1,85-kb que contiene el gen <i>lpsL</i> de <i>S. fredii</i> HH103, Km ^R	Esta Tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2017
----------	---	--

pMUS1346	pMUS1346 con el casete <i>lacZ</i> Δp-Gm ^R inserto en los puntos <i>Sall</i> del gen <i>lpsL</i> , Kan ^R →←, Ap ^R , Gm ^R	Esta Tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2017
----------	--	--

Construcciones que portan el gen *rkpK*

pMUS1120	Plásmido pBluescript II SK que porta un fragmento <i>XhoI-EcoRI</i> de ~1,41-kb que contiene el gen <i>rkpK</i> de <i>S. fredii</i> HH103, Ap ^R	Esta Tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2017
pMUS1129	pMUS1120 con el casete <i>lacZ</i> Δp-Gm ^R inserto en los puntos <i>SphI</i> del gen <i>rkpK</i> , Ap ^R , Gm ^R	Esta Tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2017
pMUS1131	pK18 <i>mob</i> que contiene un fragmento de ~5,3-kb procedente de pMUS1129 que contiene el gen <i>rkpK::lacZ</i> Δp-Gm ^R , Km ^R , Gm ^R	Esta Tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2017
pMUS1401	pK18 <i>mob</i> que contiene un fragmento de ~2,15-kb que contiene el gen <i>rkpK</i>	Esta Tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2017

Construcciones con los genes *rkpK* y *lpsL*

pMUS1193	Cósmido pLAFR1 que contiene los genes <i>lpsL</i> y <i>rkpK</i> de la región <i>rkp-2</i> de <i>S. fredii</i> HH103, Tc ^R	Esta Tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2017
----------	--	--

Construcciones que portan el gen *mucR1*

pMUS1175	Plásmido pK18 <i>mob</i> que contiene un fragmento <i>HindIII-BamHI</i> de ~1,7-kb con el gen <i>mucR1</i> de <i>S. fredii</i> HH103. Km ^R	Esta Tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2016c
pMUS1176	Plásmido pK18 <i>mob</i> que contiene un fragmento <i>HindIII-BamHI</i> de ~1-kb con el gen <i>mucR1</i> de <i>S. fredii</i> HH103 deleciónado. Km ^R	Esta Tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2016c

pMUS1196	Plásmido pPHU231 con un fragmento <i>Xba</i> I- <i>Hind</i> III de ~0,37-kb de la región promotora de <i>mucR1</i> de <i>S. fredii</i> HH103	Esta Tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2016c
pMUS1203	Plásmido pDONR207 que porta un fragmento de ~0,5 kb que contiene el gen <i>mucR1</i> de <i>S. fredii</i> HH103 clonado a través del sistema Gateway, Gm ^R	Esta Tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2016c
pMUS1224	pMUS1175 con el casete <i>lacZ</i> Δp-Gm ^R inserto en el punto <i>Pm</i> II del gen <i>mucR1</i> . Km ^R , Gm ^R	Esta Tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2016c
pMUS1398	Plásmido pGEX-KG que porta un fragmento de ~0,5 kb que contiene el gen <i>mucR1</i> de <i>S. fredii</i> HH103 clonado a través del sistema Gateway a partir de pMUS1203, Ap ^R	Esta Tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2016c

Construcciones que portan el gen *mucR2*

pMUS1195	Plásmido pK18mob que contiene un fragmento <i>Eco</i> RI- <i>Sma</i> I de ~2,2-kb con el gen <i>mucR2</i> de <i>S. fredii</i> HH103. Km ^R	Esta Tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2016c
pMUS1222	pMUS1195 con el casete <i>lacZ</i> Δp-Gm ^R inserto en el punto <i>Pm</i> II del gen <i>mucR2</i> . Km ^R , Gm ^R	Esta Tesis, Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2016c

Ap: ampicilina, Gm: gentamicina, Km: kanamicina, Nal: ácido nalidíxico, Sp: espectinomycinina, Sm: estreptomycinina, Tc: tetraciclina. Rif: rifampicina.

1.1.2. Agentes selectivos e identificativos

Para la selección e identificación de las diferentes estirpes bacterianas y plásmidos se utilizaron los siguientes agentes selectivos, suministrados por Sigma (EEUU), a las concentraciones indicadas:

Agente selectivo	Solución stock (mg mL ⁻¹)	<i>S. fredii</i> (μg mL ⁻¹)	<i>E. coli</i> (μg mL ⁻¹)
Ampicilina (Ap)	100	-	100

Espectinomicina (Sp)	50	50	100
Gentamicina (Gm)	50	5-50	10
Kanamicina (Km)	30	60	30
Ácido nalidíxico (Nal)	10	10	20
Rifampicina (Rif)	25	50	25
Tetraciclina (Tc)	10	1-2	10
X-gal	20	40	40
Sacarosa		12,5%	
X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -d-galactopiranosido.			

La rifampicina se disolvió en metanol, el cloranfenicol en etanol absoluto, la tetraciclina en etanol al 70% y el ácido nalidíxico en una solución de NaOH 0,1 M. Los demás antibióticos se disolvieron en agua. La temperatura de almacenamiento de los antibióticos fue de -20°C.

El X-gal, suministrado por Roche (Suiza), se disolvió en N, N-dimetilformamida (40 mg mL⁻¹) y también se conservó a -20°C.

1.1.3. Flavonoides

La isoflavona genisteína y la flavona, suministradas por Sigma Aldrich (EEUU), se disolvieron a una concentración de 1 mg mL⁻¹ en etanol absoluto y se añadieron a los cultivos para alcanzar una concentración final de, aproximadamente, 3,7 μ M. La temperatura de almacenamiento fue de -20°C.

1.2. Medios de cultivo

1.2.1. Medios de cultivo para *Sinorhizobium*

Las estirpes de *Sinorhizobium* se cultivaron en los medios que se detallan a continuación. Los cultivos líquidos se incubaron en agitación a 180 r.p.m. Los medios se solidificaron, cuando fue necesario, añadiendo 20 g L⁻¹ de agar. En ambos casos la temperatura de incubación fue de 28°C.

Medio TY (Behringer, 1974)

Extracto de levadura	3 g
Triptona	5 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,87 g (sólido) o 0,46 g (líquido)
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C).

Medio YM (Vincent, 1970)

K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extracto de levadura	0,4 g
Manitol	10 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C).

Medio Bromfield (Sourjik y Schmitt, 1996)

Extracto de levadura	0,5 g
Triptona	0,1 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,1 g
Agar bacteriológico	3 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C).

Medio Mínimo# (Behringer, 1974)

K ₂ HPO ₄	0,3 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,15 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,05 g
FeCl ₃	0,006 g
NaCl	0,05 g
Glutamato sódico	1,1 g
Manitol	10 g
Solución de vitaminas*	1 mL
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C).

#Para los experimentos de movilidad en superficie, el manitol se sustituyó por glicerol como fuente de carbono y el agar se sustituyó por agarosa como agente gelificante.

Solución de vitaminas* (1000X)

Biotina	0,02 g
Tiamina	0,01 g
Pantotenato sódico	0,01 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 100 mL

Se esterilizó por filtración y se adicionó 1 mL por litro de MM ya estéril.

Medio MGM (O'Toole y Kolter, 1998)

Base	
MOPS	10,46 g
Manitol	10,02 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L
Glutamato sódico*	10 mL
MgSO ₄ 7H ₂ O*	10 mL
CaCl ₂ 2H ₂ O*	1 mL
K ₂ HPO ₄ *	1 mL
KH ₂ PO ₄ *	0,1 mL
Biotina*	0,1 mL

La base se preparó independientemente de las soluciones, se le ajustó el pH a 6,8-7,0 y se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C).

Soluciones*

Glutamato sódico (100X)	35,55 g	100 mL
MgSO ₄ 7H ₂ O (100X)	2,46 g	
CaCl ₂ 2H ₂ O (1000X)	1,83 g	50 mL
Biotina (1000X)	0,048 g	
K ₂ HPO ₄ (10000X)	4,35 g	
KH ₂ PO ₄ (10000X)	3,40 g	

Las soluciones se esterilizaron por filtración y se adicionaron los volúmenes correspondientes por litro de base de MGM ya estéril.

Medio B- (van Brussel *et al.*, 1977)

Base	
Manitol	10 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,55 g
KNO ₃	0,55 g
Ca(NO ₃) 4H ₂ O	1,3 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L
Solución de fosfato*	10 mL
Solución de micronutrientes*	2,5 mL
Solución de Fe-EDTA*	2,5 mL
Solución de vitaminas*	1 mL

La base se preparó independientemente de las soluciones, se le ajustó el pH a 5,0 y se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C).

Solución de fosfato*

KH ₂ PO ₄	1,36 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 100 mL

Solución de micronutrientes*

MnSO ₄ 4H ₂ O	0,609 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,1 g
H ₃ BO ₄	1,27 g
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,4 g
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,04 g

H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L
Solución de Fe-EDTA*	
Fe(III) EDTA	1,3 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 100 mL
Solución de vitaminas*	
Biotina	0,061 g
Tiamina	0,010 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 100 mL
Las soluciones se esterilizaron por filtración y se le añadieron los volúmenes adecuados por cada litro de base ya estéril.	

1.2.2. Medios de cultivo para *Escherichia coli*

Para cultivar las estirpes de *E. coli* se utilizó el medio rico de Luria-Bertani (LB). Los cultivos líquidos se incubaron en agitación a 180 r.p.m. Los medios se solidificaron, cuando fue necesario, añadiendo 20 g L⁻¹ de agar. En ambos casos la temperatura de incubación fue de 37°C.

LB (Maniatis <i>et al.</i>, 1982)	
Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
NaCl	5 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L
El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C).	

1.2.3. Solución de Conservación de bacterias

Para conservar las estirpes bacterianas durante largos periodos de tiempo se utilizó una solución de congelación. Tras cultivar las bacterias en los medios apropiados, la biomasa procedente de 5 mL de cultivo se resuspendió en 2 mL de una solución compuesta de peptona al 0,5% (m/v) y de glicerol al 15% (v/v) que se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C). Las bacterias así preparadas se conservaron a -80°C.

1.3. Medidas de pH y espectrometría

El pH de las soluciones se midió con un pH-metro modelo micropH 2001 (Crison, España). Para realizar las medidas espectrofotométricas se empleó el espectrofotómetro Novaspec II (Pharmacia LKB, Suecia) y el lector de placas Synergy HT (BioTek, USA).

1.4. Estudio de los polisacáridos superficiales de la bacteria *S. fredii* HH103

1.4.1. Estudios de Resonancia Magnética Nuclear (H-RMN)

Estos estudios se llevaron a cabo en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla por el grupo del Profesor Miguel Ángel Rodríguez Carvajal y con la colaboración de la Profesora Piedad del Socorro Murdoch, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla.

Se realizaron análisis de dos tipos de muestras en función del tipo de polisacárido a analizar. Para el análisis del KPS y de los GC presentes en el espacio periplásmico, fue necesario la biomasa obtenida tras cultivar 1 L de cada estirpe en medio TY durante 3-6 días, la cual fue recolectada por centrifugación y posteriormente lavada tres veces con NaCl 0,9% (m/v). El precipitado de células o *pellet* se congeló a -20°C hasta su uso para la extracción de los polisacáridos y posterior H-RMN, cuyas metodologías han sido descritas por Rodríguez-Carvajal *et al.* (2001). En el caso del análisis de los EPS y GC extracelulares, se cultivaron las diferentes estirpes en 200 mL de medio YM durante 96-100 horas aproximadamente y posteriormente se centrifugaron para obtener el sobrenadante. Estas muestras se almacenaron (en caso necesario necesario) a 4°C durante 1-2 días, como máximo, hasta someterlo al tratamiento descrito en Acosta-Jurado *et al.* (2016b) para su posterior análisis mediante H-RMN. De forma abreviada, el sobrenadante de los cultivos se mezcló con 3 volúmenes de etanol obteniendo un precipitado que contiene el EPS, el cual, se retiró mediante centrifugación y resuspensión para posteriormente purificarlo mediante diálisis. Por otro lado, el sobrenadante libre de EPS se concentró al 5% de su volumen inicial, se mezclaron 10 mL del mismo con 10 volúmenes de etanol para precipitar la fracción de bajo peso molecular que contiene los GC extracelulares. El precipitado obtenido se disolvió en agua y se dializó para posteriormente concentrarlo y eliminar las sales mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Por último, estas muestras se sometieron a análisis de H-RMN.

1.4.2. Tinción con Rojo Congo y unión a Calcoflúor

Se emplearon para caracterizar la capacidad de las estirpes para unir estos colorantes en función de las características de su superficie, que varía en función de la estructura de los polisacáridos que posean.

La unión a calcoflúor se estudió mediante cultivo en placas de TY sólido suplementadas con calcofluor (Sigma, Fluorescent brightener 28) 0,02% (m/v). Para ello, se dispusieron gotas de 20 µl de los cultivos de las diferentes estirpes, a una densidad óptica (D.O.₆₀₀) de 0,4-0,5, sobre estas placas y se incubaron durante 96-120 horas. Las gotas se expusieron a luz ultravioleta (UV, 260 nm) y se fotografiaron.

La tinción con rojo congo se realizó en placas de TY suplementadas con rojo congo a una concentración de 25 mg/L. Al igual que para la unión de calcofluor, se colocaron gotas de 20 µl de los cultivos a una D.O.₆₀₀ de 0,4-0,5 y se incubaron durante 96-120 horas. Por último, se fotografiaron o escanearon.

1.4.3. Estudio del lipopolisacárido (LPS)

Obtención de muestras enriquecidas en LPS a partir de cultivos celulares.

Se llevó a cabo el siguiente procedimiento para su obtención:

- Siembra de las estirpes en placas de TY con los antibióticos adecuados durante 4 días a 28°C.
- Recolectar y resuspender una pequeña cantidad de biomasa (aproximadamente 40-60 mg) en 1 mL de NaCl al 0,9% (m/v).
- Centrifugar 5 minutos a 8.000 r.p.m. y descartar el sobrenadante.
- Lavar tres veces más con NaCl al 0,9% (m/v) e intentar eliminar el máximo posible de sobrenadante en el último lavado.
- Agregar 125 µL de tampón 1 a cada muestra, agitar con vórtex y hervir durante 6 minutos.
- Añadir 875 µL de tampón 2, 3 µL de solución de ARNasa y 10 µL de solución de ADNasa a cada muestra. Incubar durante 4 ó 5 horas a 37°C.
- Agregar 15 µL de solución de proteinasa K, mezclar con vórtex e incubar durante 12-15 horas a 37°C.
- Añadir de nuevo 15 µL de solución de proteinasa K e incubar durante 24 horas a 37°C.
- Transferir 350 µL de cada muestra a un nuevo vial eppendorf (la fracción sobrante se almacena a -20°C).

- Añadir 1 volumen de tampón de resuspensión, agitar manualmente y hervir durante 6 minutos.
- Centrifugar las muestras durante 7 minutos a 12.000 r.p.m. y transferir 600 μ L del sobrenadante de cada muestra a nuevos viales.
- Las muestras procesadas de este modo se conservan a -20°C hasta su uso en electroforesis.

Soluciones empleadas:

Tampón 1	Tris-HCl 60 mM pH 6,8, EDTA 1 mM, SDS 2% (m/v) en H ₂ O
Tampón 2	Tris-HCl 60 mM pH 6,8; EDTA 1 mM.
Tampón de resuspensión	5,9 mL Tampón 1, 4 mL glicerol puro, 0,8 mL β -mercaptoetanol, 0,05% (v/v) de una solución saturada de azul de bromofenol,
Solución de ADNasa I	ADNasa I 1mg /mL en Tris-HCl 20 mM pH 7,5, MgCl ₂ 1 mM.
Solución de ARNasa A	ARNasa 10 mg /mL en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 15 mM. Hervir 15 minutos.
Solución de Proteinasa K (PK)	PK 1 mg /mL en H ₂ O.

Electroforesis de LPS.

La electroforesis de las muestras de LPS se realizó en geles de poliacrilamida (40% acrilamida:bisacrilamida (37,5:1) al 15% en cubetas Mini Protean III (Bio-Rad) a 200V durante 10 minutos y posteriormente a 175V durante 60 minutos aproximadamente. La realización de los geles se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante de la poliacrilamida (Bio-Rad).

Soluciones empleadas

Tampón de electroforesis de LPS	Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% (m/v). Ajustar el pH 8,3
---------------------------------	---

Visualización del LPS.

Para la visualización de los LPS se usó la tinción de plata según Kittelberger y Hilbink (1993). Todos los pasos se realizaron en agitación a temperatura ambiente.

- Mantener el gel durante un mínimo de 3 horas en tampón de fijación.
- Cambiar la solución por la de oxidación y mantener durante 10 minutos.
- Realizar 5 lavados de 5 minutos cada uno con H₂O_d.
- Incubar con la solución de plata durante 30 minutos en oscuridad.
- Lavar brevemente con H₂O_d.
- Añadir la solución reveladora y mantener en oscuridad hasta que aparezcan las bandas.
- Parar la reacción lavando abundantemente con H₂O_d.
- Una vez parada la reacción se puede mantener el gel en H₂O_d o en Na₂EDTA al 1.46% (m/v) en H₂O_d.

Soluciones empleadas

Solución de Fijación	Etanol 30%(v/v), ácido acético 10% (v/v) en agua destilada
Solución de oxidación	Peryodato sódico 0,7% (NaIO ₄) (m/v) en solución de fijación.
Solución de tinción	Nitrato de plata 0,1% (AgNO ₃) (m/v) en agua destilada.
Solución reveladora	Carbonato sódico 3% (Na ₂ CO ₃) (m/v), 0,035% de formaldehído al 37% (v/v) en agua destilada

1.4.4. Detección inmunológica de LPS

Transferencia de las muestras a filtro de nitrocelulosa

Una vez llevada a cabo la electroforesis, se equilibran durante 15 minutos en tampón LKB los siguientes elementos: 2 papeles Whatman del tamaño del gel (habiendo retirado anteriormente el *stacking* o gel de empaquetamiento) y 1 filtro de nitrocelulosa del tamaño del gel. Una vez equilibrados, se disponen los elementos de la transferencia en el casete con el siguiente orden: almohadilla, papel Whatman, gel bocarriba, membrana

de nitrocelulosa, papel Whatman y almohadilla. La transferencia se lleva a cabo a 20V durante 1 hora en cubetas Mini Protean III (Bio-Rad).

Inmunodetección del LPS

Todos los pasos se realizan a temperatura ambiente:

- Lavar 2 veces la membrana con TBS1X durante 5 minutos.
- Bloquear la membrana con TBS1X+4% de leche en polvo+0,1% Tween 20, en agitación durante una hora.
- Incubación del anticuerpo primario anti-LPS NB6.228.22 (usado al 2%) durante toda la noche en agitación a 4°C en TBS1X+4% de leche en polvo+0,1% Tween 20.
- Lavar 3 veces con TBS1X durante 10 minutos.
- Lavar con TBS1X+4% de leche en polvo+0,1% Tween 20 durante 1 hora.
- Incubar con el anticuerpo secundario (anti-Rat IgG-fosfatasa alcalina, Sigma) durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo se usa a una dilución de 1:1000 en TBS1X+4% de leche en polvo+0,1% Tween 20.
- Lavar con TBS1X durante 5-10 minutos, 5 veces.
- Lavar con Tris-HCl 0,1 M pH 9,6 durante 10 minutos.
- Revelar la inmunodetección con una mezcla de 5 mL de Tris-HCl 0,1M pH 9,6; 30 µL de NBT, 30 µL de BCIP y 250 µL de MgCl₂ 1M hasta que aparezcan las bandas.
- Detener la reacción con H₂O

Soluciones empleadas:

Tampón de LKB	Tris-base 48 mM, glicina 39 mM, Metanol 20% (v/v), SDS 0,04% (m/v). Ajustar pH a 9,1.
TBS1X	Tris-base 20 mM, 150 mM NaCl, ajustar pH a 7,6 con HCl.

1.4.5. Estudio del polisacárido capsular tipo antígeno K (KPS)

Obtención de muestras enriquecidas en KPS a partir de cultivos celulares.

Para ello se realizan los siguientes procedimientos:

- Cultivar las bacterias en TY sólido durante 4 días o en TY líquido durante 2 días a 28°C, con los antibióticos correspondientes.
- Resuspender una pequeña cantidad de biomasa (aproximadamente 50 ± 10 mg del cultivo en sólido), o el pellet de haber centrifugado 3 mL del cultivo líquido, en 1 mL de NaCl al 0,9% (m/v).
- Centrifugar 5 minutos a 9000 r.p.m.
- Lavar tres veces más las células con NaCl al 0,9% (m/v) y eliminar completamente el sobrenadante tras el último lavado.
- Resuspender el pellet mediante pipeta y/o vórtex de forma diferente en función de la procedencia del cultivo:
 - a. Para los cultivos sólidos: en 500 μ L de tampón KPS1X.
 - b. Para los cultivos líquidos: en 250 μ L de tampón KPS1X.
- Hervir las muestras 6 minutos a 100°C, agitar en vórtex y dejar enfriar.
- Añadir 3 μ L de solución de ARNasa A y 10 μ L de solución de ADNasa I a cada vial. Incubar 4-5 horas a 37°C.
- Añadir 15 μ L de solución de proteinasa K a cada vial, agitar e incubar 12-15 horas a 37°C.
- Añadir 15 μ L de solución de Proteinasa K a cada vial e incubar durante 24 horas.
- Centrifugar durante 5 minutos a 13000 r.p.m. y traspasar todo el sobrenadante a un nuevo vial.
- Añadir sacarosa 1M y etanol absoluto:
 - a. Para las muestras procedentes de cultivo líquidos: 400 μ L del sobrenadante + 680 μ L de sacarosa 1M estéril + 120 μ L del etanol absoluto.
 - b. Para muestras procedentes de cultivo sólidos: 200 μ L del sobrenadante + 340 μ L de sacarosa 1M estéril + 60 μ L del etanol absoluto.
- Almacenar las muestras a -20°C hasta su uso.

Soluciones empleadas:

Tampón de KPS 1X	Tris-HCl 50 mM pH 8,5, EDTA 13 mM, H ₃ BO ₃ 15 mM.
Solución de ADNasa I	ADNasa I 1 mg /mL de Tris-HCl 20 mM pH 7,5, MgCl ₂ 1 mM.
Solución de ARNasa A	ARNasa 10 mg /mL de Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 15 mM. Hervir 15 minutos.
Solución de Proteinasa K (PK)	PK 1 mg/mL en H ₂ O dd.

Electroforesis de KPS.

La electroforesis de las muestras enriquecidas en KPS se realizó en un gel de poliacrilamida (40% acrilamida:bisacrilamida (37,5:1) al 18% en tanque Mini Protean III (Bio-Rad) a 200 V durante 70-90 minutos. Para la obtención de los geles se siguen las instrucciones del fabricante de la poliacrilamida (Bio-Rad) añadiendo un 10% de etanol absoluto y usando la solución Tris-HCl pH 8,8 a 1M como tampón. Se añadieron 2 µL de una solución saturada de azul de bromofenol en agua destilada a cada pocillo antes de cargar las muestras en los geles de poliacrilamida. En el caso de este tipo de geles, y a diferencia de los geles de LPS, no se adiciona SDS.

Soluciones empleadas:

Tampón de electroforesis de KPS	Tris 25 mM, glicina 192 mM, etanol absoluto 10% (v/v). Ajustar el pH a 8,3.
---------------------------------	--

Visualización del KPS

Para la visualización de los KPS se usó el siguiente procedimiento. Todos los pasos se realizaron en agitación a temperatura ambiente:

Introducir el gel durante un mínimo de 30 a 45 minutos en una solución fijadora con azul alciano. Pasado este tiempo se reemplaza la solución por la solución de fijación y se mantiene como mínimo 3 horas. Una vez completada la fijación se realiza la tinción del KPS con el mismo procedimiento que para el LPS.

Soluciones empleadas:

Solución de azul alciano	Azul alciano al 0,5% en ácido acético al 2% en H ₂ O. La solución se puede reutilizar varias veces
--------------------------	---

1.4.6. Estudio del exopolisacárido (EPS)

Visualización de la producción de EPS

La producción de EPS se analizó de forma visual mediante el crecimiento de las estirpes en placas de YMA. Para ello, se inocularon tubos de YM líquido con las diferentes estirpes, suplementados con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 28°C en agitación durante 48 horas. Los cultivos se reinocularon en tubos de YM líquido y se incubaron en las mismas condiciones hasta una D.O.₆₀₀ de 0,4 aproximadamente. Se colocaron gotas de 20 µl en placas de YMA, suplementadas o no con genisteína, y se incubaron durante 96 horas a 28°C y posteriormente 48 horas a temperatura ambiente, para finalmente fotografiarlas.

Estimación de la cantidad de EPS

Para ello se cuantificó la cantidad de equivalentes de glucosa (µg/mL) presentes en el sobrenadante de cultivos líquidos de las bacterias a estudiar. Para ello, se inocularon tubos de YM, suplementados con los antibióticos adecuados, de las estirpes a analizar. Una vez crecidos, se reinocularon matraces de 250 mL con 20 mL de YM líquido, suplementados o no con genisteína, y se incubaron a 28°C durante 96 horas hasta obtener cultivos con una D.O.₆₀₀ de 1,2-1,3. Los cultivos se centrifugaron a 20.000 x g durante 15 minutos y la cantidad de carbohidratos total presentes en el sobrenadante se cuantificó mediante el método de antrona-H₂SO₄, descrito previamente por Abarca-Grau (2012) y en el que se realiza una medida del contenido de azúcares reducidos en el medio.

1.5. Curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento se realizaron en tubos de vidrio con 3 mL de medio TY, YM o MGM con antibióticos en caso de que la estirpe portara algún plásmido. Se partió de una densidad celular inicial de 5 x 10⁷ células mL⁻¹, diluyendo de un preinóculo de TY,

YM o MGM con antibióticos hasta una D.O.₆₀₀ de 1. La turbidez de los cultivos se determinó a intervalos regulares de tiempo en un espectofotómetro a una D.O.₆₀₀.

1.6. Ensayos de osmotolerancia

El estudio de la capacidad de tolerar el estrés osmótico por parte de *S. fredii* HH103 se llevó a cabo creciendo las diferentes estirpes en medio MM suplementados con NaCl o sacarosa a diferentes concentraciones. Para ello se crecieron las estirpes de *S. fredii* HH103 en tubos con medio TY suplementado con los correspondientes antibióticos durante 48 h, tras lo que se reinocularon y se crecieron hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 1. A continuación, se realizaron diluciones seriadas con factor 10 hasta un factor de dilución de 10^6 para posteriormente colocar gotas de 10 μ L de cada dilución en placas con medio MM suplementados con NaCl o sacarosa a diferentes concentraciones. Las placas se incubaron 24 horas bocarriba y 72 horas bocabajo para posteriormente ser escaneadas. Las concentraciones empleadas fueron 0, 25, 50 y 100 mM para NaCl y 5% y 10% (m/v) para sacarosa.

1.7. Ensayos de formación de biopelícula (*biofilm*)

La medida de la capacidad de formación de *biofilm* sobre superficies plásticas por parte de *S. fredii* HH103 y sus derivados se realizó por el método descrito por Margaret *et al.* (2013). Para ello se crecieron los cultivos en medio MGM, se diluyeron hasta una D.O.₆₀₀ de 0,2 y se inocularon 100 μ L de cultivo en placas multipocillos de poliestireno. Las placas se cerraron con una tapa estéril para prevenir la evaporación y se incubaron boca abajo a 28°C durante 48 horas sin agitación. El crecimiento bacteriano se cuantificó a través de la medida de la D.O.₆₀₀ al final del experimento. El contenido de los pocillos se retiró y se secó a temperatura ambiente para luego lavarlos 3 veces con solución salina estéril. Posteriormente se secaron los pocillos, se tiñeron con 100 μ L de cristal violeta 0,1% durante 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente. Por último, la cuantificación del *biofilm* formado se llevó a cabo por la adición de 100 μ L de etanol 96% en cada pocillo para solubilizar el cristal violeta y el cálculo de la cantidad de colorante que se había unido mediante un lector de placas multipocillos a una D.O.₅₇₀ (Synergy HT; BioTek; Winooski, Vermont, USA). Las medidas de crecimiento de adhesión se hicieron por duplicado y cada

experimento se llevó a cabo por triplicado. Además, en cada experimento se midieron al menos 12 pocillos por tratamiento.

En el caso de la formación de *biofilm* sobre superficies de vidrio, las estirpes de *S. fredii* HH103 portando el plásmido pSKDSRED (Kelly *et al.*, 2013) se crecieron (partiendo de una D.O.₆₀₀ de 0,2) en 40 mL de medio MGM en cubetas Coplin estériles a 28°C en estático y conteniendo portacristales estériles en posición vertical. A las 24 y 96 horas, se retiraron varios portacristales, se secaron a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron en NaCl 0,9% 3 veces. Una vez lavados, se secaron y se observaron y fotografiaron usando el microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse Ti-U con longitudes de onda (λ) de excitación y emisión de 554 y 586 nm, respectivamente. Se examinaron 3 secciones diferentes de los portas (desde la base a la parte superior): 5, 28 y 49 mm, siendo la última la zona correspondiente a la interfase aire-líquido.

1.8. Ensayos de auto-agregación

Este tipo de ensayo se usó para medir la capacidad de floculación o agregación de las diferentes estirpes y se realizó según lo descrito por Sorroche *et al.* (2012). Las bacterias se crecieron en TY con antibióticos durante 24 horas a 28°C. Posteriormente se reinocularon 50 μ L de cultivo en 5 mL de MGM y se incubó 48 horas a 28°C. El contenido de cada tubo se transfirió a un tubo de plástico estéril y se mantuvo 24 horas a 4°C para evitar el crecimiento de las bacterias. Se transfirió 200 μ L de la parte superior del cultivo a una placa multipocillo y se midió la D.O.₆₀₀ (D.O. final), posteriormente se agitaron los tubos con *vortex* (o mezclador de vórtice) durante 30 segundos y se repitió la misma operación para obtenerse la D.O.₆₀₀ (D.O. inicial). Por último, se calculó el % de auto-agregación:

$$\% \text{ de auto-agregación} = 100 \times [100 - (D.O._{\text{final}} / D.O._{\text{inicial}})]$$

1.9. Ensayos de movilidad

Los ensayos de movilidad se realizaron en colaboración con la Doctora María José Soto Missfut del Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos (Estación

Experimental del Zaidín, Granada) y la Doctora Cynthia Alías Villegas del Departamento de Microbiología (Universidad de Sevilla).

1.9.1. Ensayos de movilidad en superficie

Para mantener la reproducibilidad de los experimentos, los cultivos líquidos de las diferentes estirpes fueron inoculados partiendo del stock de glicerol conservado a -80°C. Las estirpes de *S. fredii* HH103 se crecieron a 28°C en medio TY líquido hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 0,9-1. Las células se recuperaron por centrifugación (3 minutos a 12.000 g), se lavaron dos veces con MM y se resuspendieron en una décima parte del volumen inicial con el mismo medio. Se colocaron alícuotas de 2 µl de la suspensión en placas de Petri que contenían 20 mL de MM con glicerol como fuente de carbono y 0,4% de agarosa (m/v), con genisteína, con etanol como control por ser el solvente del flavonoide o en ausencia de ambos. Las placas se secaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las gotas colocadas en la superficie se dejaron secar a temperatura ambiente durante 10 minutos y las placas se incubaron en posición invertida durante 24, 48 y 72 horas. La comparación de la movilidad en superficie entre las estirpes mutantes y el parental se realizó mediante la medida de la longitud de cada uno de los lados del teórico rectángulo que engloba a la colonia (en centímetros) y realizando la media de estos valores (3 réplicas por experimento). Se realizaron un mínimo de tres experimentos independientes y a los resultados obtenidos se les realizó la estadística correspondiente.

1.9.2. Ensayos de movilidad de tipo *swimming*

De igual forma que en la movilidad en superficie, las diferentes estirpes se crecieron a partir del stock de glicerol, a 28°C en medio TY líquido hasta una D.O.₆₀₀ de 0,9-1. Las placas de Petri se prepararon con 25 mL de medio Bromfield con 0,3% de agar (m/v), suplementado con genisteína, con etanol o en ausencia de ambos, y se secaron a temperatura ambiente cerradas durante al menos dos horas. Alícuotas de 3 µl del cultivo se introdujeron con la punta hasta la mitad del grosor del medio de cultivo. Una vez colocadas las gotas, las placas se rodearon de *parafilm* y se incubaron en posición invertida durante 24, 48 y 72 horas, tiempo en el que se tomaron las diferentes medidas (3 réplicas por experimento). La comparación de la movilidad *swimming* con respecto al parental, se realizó midiendo el halo de dispersión de la colonia en los diferentes

tiempos y con al menos tres experimentos independientes. Por último, se les realizó el test estadístico correspondiente.

1.10. Métodos relacionados con ácidos nucleicos

1.10.1. Métodos de transferencia de ADN

1.10.1.1. Conjugación bacteriana

Para la transferencia por conjugación de diversos plásmidos desde *E. coli* a *Sinorhizobium* se llevó a cabo el siguiente procedimiento

- Se mezclaron en un tubo eppendorf los siguientes cultivos:

1. 800 μ L de cultivo de la estirpe de *Sinorhizobium* receptora.
2. 200 μ L de un cultivo en fase logarítmica de la estirpe de *E. coli* donadora del plásmido en cuestión.
3. 100 μ L de un cultivo en fase logarítmica de la estirpe de *E. coli*, portadora del plásmido pRK2013, que actuó como coadyuvante en la transferencia de los plásmidos (que contienen el sitio *mob*).

A continuación, la mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 11000 *g*. El sobrenadante se retiró con cuidado y las células se resuspendieron en 200 μ L de agua destilada estéril, volviéndose a centrifugar a 11000 *g* durante 2 minutos, para retirar los restos de antibióticos. Seguidamente, se retiró el sobrenadante dejando alrededor de 75 μ L para resuspender el pellet y se colocó en forma de parche en una placa con medio TY sin antibióticos. La placa se incubó a 28°C durante no más de 24 horas. La masa celular desarrollada se recogió y se resuspendió en 1 mL de TY. Posteriormente se realizaron las diluciones apropiadas para sembrar placas de TY con los antibióticos adecuados y así seleccionar las estirpes transconjugantes. Las colonias desarrolladas se purificaron por sucesivas siembras en el mismo medio selectivo.

1.10.1.2. Transformación de *E. coli*.

Preparación de células competentes de *E. coli*

Se preinoculó una colonia de *E. coli* en 5 mL de medio LB, con los antibióticos adecuados, y se creció a 37°C en agitación durante toda la noche. Posteriormente, se añadieron 2,5 mL del cultivo crecido a 200 mL de medio LB, con los mismos antibióticos, y se incubó a

37°C en agitación hasta que la D.O.₆₀₀ fue de 0,4-0,5. El cultivo se enfrió en hielo durante 15 minutos.

Transcurrido este tiempo, el cultivo se centrifugó a 3500 *g* durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 30 mL de solución TBF-I a 4°C. La mezcla se incubó en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 3500 *g* durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 4 mL de solución TBF-II a 4°C. Se repartieron alícuotas de 75 µL en eppendorfs, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Soluciones empleadas

TFB-I	AcK 3 M pH 5,8, MnCl ₂ 1 M, CaCl ₂ 1 M, RbCl 1 M, Glicerol 15%
TFB-II	MOPS 1 M pH 7*, CaCl ₂ 1 M, RbCl 1 M, Glicerol 15%

Las soluciones se esterilizaron en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C). * Este componente se esterilizó por filtración y después de añadió a la solución previamente esterilizada en el autoclave. AcK: Acetato potásico; MOPS: Ácido 3-(N-morfolino)propanesulfónico).

Transformación usando células competentes de *E. coli*

Las células de *E. coli* competentes se descongelaron en hielo durante 5 minutos. Se añadió el ADN plasmídico o la mezcla de ligación a cada vial, se mezcló suavemente con la pipeta y se incubó en hielo durante 20 minutos. Posteriormente, se incubó durante 90 segundos en un baño a 42°C y, una vez transcurrido ese tiempo, se incubó rápidamente en hielo durante 5 minutos. Se añadió 1 mL de medio LB y se incubó a 37°C en agitación durante una hora. Tras la incubación, se centrifugó durante 30 segundos a 10000 *g* y se descartó el sobrenadante, dejando alrededor de 75 µL, los cuales se usaron para resuspender el pellet. La mezcla se sembró en placas de medio LB, con los antibióticos adecuados, y se incubó a 37°C durante 24 horas.

1.10.2. Extracción del ADN genómico

Se centrifugaron 1,5 mL de un cultivo en fase estacionaria a 13000 *g* durante 1 minuto. El pellet se resuspendió en 570 µL de tampón TE y se añadió 6 µL de proteinasa K (10

mg/mL) y 30 μ L de SDS al 20% (m/v). La mezcla se incubó durante toda la noche a 37°C. Posteriormente, se potenció el lisado de las células mediante el uso de una jeringuilla por la se pasó tres veces el contenido de la mezcla y a ésta se le añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Los líquidos se mezclaron manualmente mediante la inversión del tubo, tras lo que el tubo se centrifugó a 13000 *g* durante 5 minutos. La fase superior acuosa donde se encuentran los ácidos nucleicos se transfirió a un nuevo tubo y se añadió un volumen de solución cloroformo:isoamilalcohol (24:1) mezclando las dos fases por inversión del tubo. Se centrifugó a 13000 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente y la fase superior (acuosa) se transfirió a un nuevo tubo.

A continuación, se procedió a la precipitación del ADN. Para ello, se añadió 0,1 volumen de acetato sódico 3M y 0,8 volumen de isopropanol, se mezcló suavemente y se dejó precipitar a -80°C durante 20 minutos. Seguidamente, se centrifugó a 13000 *g* durante 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante, el pellet se lavó con 500 μ L de etanol al 70% (v/v) y se centrifugó a 13000 *g* durante 4 minutos a 4°C. Finalmente, se dejó secar al precipitado de ADN a temperatura ambiente durante 30-40 minutos y se resuspendió en 100 μ L de tampón TER.

Solución empleada

TER	Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM, pH 8, ARNasa 50 μ g mL ⁻¹
-----	---

Además de este método manual, para la extracción del ADN total de las bacterias en ocasiones se utilizó el *Quantum prep Aquapure Genomic DNA isolation kit* (Bio-Rad, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.10.3. Extracción del ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico se realizó siguiendo el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989), con ciertas modificaciones. Se centrifugaron 1,5 mL de un cultivo en fase estacionaria a 13000 *g* durante 1 minuto. Tras la centrifugación, se desechó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 100 μ L de solución I utilizando un agitador tipo *vortex*. A continuación, se añadieron 200 μ L de solución II y se mezcló

invirtiendo el tubo varias veces hasta que la mezcla se clarificó. Posteriormente, se añadieron 150 μL de solución III y se mezcló, para después centrifugar a 13000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se pasó a un tubo vacío y se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se mezcló mediante *vortex* y se centrifugó a 13000 g durante 5 minutos. La fase superior, acuosa, se pasó cuidadosamente a otro tubo con un pipeta y se le añadió un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se volvió a mezclar y se centrifugó a 13000 g durante 5 minutos. La fase superior se pasó cuidadosamente a otro tubo y se le añadieron 2,5 volúmenes de etanol absoluto. La mezcla se mantuvo a -80°C durante 20 minutos para que el ADN precipitara y se centrifugó a 13000 g durante 20 minutos. El precipitado se lavó con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en 20 μL de tampón TER.

Soluciones empleadas

Solución I	Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8, EDTA 10 mM, pH 8
Solución II*	NaOH 0,2M, SDS 1% (m/v)
Solución III	Acetato potásico 5M [60% (v/v)], ácido acético glacial 11,5% (v/v)
Tampón TER	Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM, pH 8, ARNasa 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$

* Preparar en el acto

La extracción de plásmidos también se realizó, cuando fue necesario, utilizando los kits *NucleoSpin Plasmid Quick Pure* (Macherey-Nagel, Alemania), *GenElute Plasmid Miniprep Kit* (Sigma, EEUU) y, en el caso de necesitar un gran volumen, *Plasmid Midi Kit* (QIAGEN, Alemania), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

1.10.4. Restricción del ADN

Se utilizaron las endonucleasas de restricción suministradas por Roche (Suiza) y NewEngland Biolabs (EEUU). En todos los casos se siguieron las instrucciones del

fabricante. La eficiencia de la restricción se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa.

1.10.5. Electroforesis del ADN

Se llevó a cabo en geles de agarosa entre el 0,6% y el 1,5% (m/v) en tampón TAE 0,5X, preteñidos con bromuro de etidio. La concentración de agarosa empleada dependió del peso molecular de los fragmentos que se quisieron separar (Sambrook *et al.*, 1989). Las muestras de ADN mezcladas con el tampón de carga se añadieron a los pocillos del gel. Como patrones de referencia se usaron diferentes marcadores de peso molecular, como el ADN del fago λ digerido con la enzima de restricción *HindIII* o marcadores tipo *ladder* de 100-pb o de 1-kb. La electroforesis se llevó a cabo en cubetas Mupid-One (Advance, Japón) a 50 ó 100 V. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV a 260 nm. Las imágenes se capturaron mediante el aparato de captación de imágenes Gel Doc 2000 (Bio-Rad, EEUU) y se analizaron con el programa informático Quantity One (Bio-Rad, EEUU).

Soluciones empleadas

Tampón TAE	Tris-HCl 30 mM, 0,002% (v/v) EDTA 0,5M pH 8, ácido acético glacial 0,00114% (v/v). Ajustar el pH a 8
Tampón de carga	Azul de bromofenol 0,25% (m/v), xileno cianol FF 0,25% (m/v), glicerol 30% (v/v)

1.10.6. Aislamiento del ADN de geles de agarosa

Para recuperar fragmentos de ADN de un gel de agarosa se cortó la porción de éste que contenía la banda de interés. El ADN se purificó mediante el kit *NucleoSpin Extract* (Macherey-Nagel, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.10.7. Desfosforilación del ADN

Se empleó para reducir la autoligación de vectores linealizados mediante restricción con una sola endonucleasa. Tras la restricción, se añadió a la mezcla de reacción la enzima fosfatasa alcalina (Roche, Suiza) y se incubó la reacción durante 30 minutos a 37°C.

Posteriormente, se inactivó la enzima añadiendo ácido etilén-glicol tetraacético (EGTA) 0,2M pH 9,0 a la mezcla de reacción en una proporción 1:10 (v/v) o incubando la mezcla durante 15 minutos a 65°C. Finalmente, la muestra se fenolizó y el ADN se precipitó con etanol absoluto.

1.10.8. Ligación del ADN

Para clonar un fragmento de ADN en un vector, los fragmentos de ADN previamente digeridos con la(s) enzima(s) de restricción adecuada(s), tratadas con fenol y precipitadas con etanol absoluto, se mezclaron en las proporciones adecuadas (3:1, inserto: vector) y se les añadió 1/10 del volumen final del tampón de ligación y 1 μL (1 U μL^{-1}) de la ligasa de T4 (Roche, Suiza; New England Biolabs, EEUU). La mezcla se incubó durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente. Los productos de la reacción se utilizaron para transformar células competentes mediante el método descrito anteriormente (1.9.1.2).

1.10.9. Amplificación del ADN por PCR

Se realizó siguiendo el protocolo descrito por Saiki (1990). Los programas usados en cada caso siguen el siguiente esquema común:

1. Desnaturalización del ADN a 95°C durante 5 minutos.
2. Desnaturalización del ADN a 95°C durante 30 segundos.
3. Unión de los cebadores al ADN de cadena simple a la temperatura recomendada por el fabricante (IDT Corporation, EEUU) durante 30 segundos.
4. Polimerización del ADN a 72°C, variando el tiempo de polimerización en función del tamaño del ADN a amplificar y de la polimerasa que se use.
5. Repetición del ciclo de polimerización (desde el paso 2), 35 veces más.
6. Polimerización del ADN a 72°C durante 5 minutos.

El volumen de la mezcla de reacción varió dependiendo del experimento. Como norma general, 20 μL de mezcla reacción contenían los cebadores adecuados a una concentración de 0,2 μM , dNTPs a 0,2 mM, tampón de PCR 1X y 0,1 U de la enzima polimerasa. Las polimerasas usadas fueron: *Taq* polimerasa (New England Biolabs, EEUU), *iTaq* (Invitrogen, EEUU) y *Velocity DNA* polimerasa (Bioline, Inglaterra), esta última se usó sólo para realizar amplificaciones donde era necesaria conservar la

secuencia sin errores, por ejemplo para realizar las construcciones para obtener un mutante por delección o para secuenciar fragmentos de ADN.

Los cebadores utilizados para la amplificación de fragmentos de ADN para su posterior clonación (**Tabla 3**) fueron diseñados con una longitud de alrededor de 20 pb, excepto los usados para clonaciones a través del sistema Gateway [(Gateway BP clonase y Gateway LR clonase (Invitrogen, EEUU)], que fueron de mayor longitud. Además, en algunos casos en las secuencias de los cebadores se incluyeron dianas para enzimas de restricción.

Tabla 3. Cebadores utilizados en esta Tesis para amplificar fragmentos de ADN para clonación. Las temperaturas de unión recogidas en la tabla se refieren a la secuencia homóloga a la del genomio “diana”.

Nombre	Secuencia (5'-3')	pb	Tm (°C)
lacZintR	GCCTCTTCGCTATTACGCCA	20	58
rkpK-F	GACCTGATGACCTTCGTCGA	20	57
rkpK-R	GAAAGGAGGTGCATCGTGGTA	21	58
lpsL-BamHI-F	CATGGATCCGCCGTTACACGAAATTCGA	30	59
lpsL-HindIII-R	CATAAGCTTCGAGATCCGTGGTGAAATGCA	30	59
mucR2-A EcoRI	ATTGAATTCAGTCTGGGGAAACACGGACC	29	60
mucR2-D SmaI	ATTCGCGGGGCCGTTTACCCAGGCACCTC	29	62
mucR1-A HindIII	ATTAAGCTTGATGGGCACGCTCGTCATTG	29	60
mucR1-D BamHI	AAAGGATCCGACCCGGTCCTGACCTTCGA	29	62
attB1mucR1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT AATGAGTGAGAATACGCTC	49	49
attB2mucR1	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA TTACTTGCCGCGACGCTT	48	59
MlnolIEco-F	CATGAATTCATGCGCTCGAGGTTTGCGATCA	31	63
MlnolIBam	CATGGATCCGGTTGTTTGTATCATCGTGACCAT	31	57

1.10.10. RT-PCR

Esta técnica se llevó a cabo para verificar si dos genes forman parte de la misma unidad transcripcional. Para ello, se realizó una extracción de ARN total, en las condiciones a estudiar, y posterior retrotranscripción del mismo modo que se describe en la sección 1.10.16.1. El ADNc obtenido se usó como molde en una PCR convencional en la que se emplearon cebadores internos de los genes a estudiar, como controles positivos de expresión, y cebadores que amplifiquen parte del extremo 3' de un gen y parte del extremo 5' del siguiente, de tal modo que, si forman una unidad transcripcional, se obtiene amplificación ya que existirá un ARNm común para ambos genes (**Tabla 4**, **Figura 13**). Además, se emplean una serie de controles:

- ADN genómico (ADNg): Se usa como molde en otra PCR en paralelo con los mismos cebadores y en la que se obtiene amplificación tanto en los cebadores internos de los genes como en los intergénicos.
- ARN: Se usa como control negativo debido a que no se debe obtener amplificación con ninguna de las parejas de cebadores al no estar presente ningún tipo de ADN (ADNc o ADNg), salvo que exista contaminación. De este modo se asegura que el ADNc de la retrotranscripción no posee ADNg.

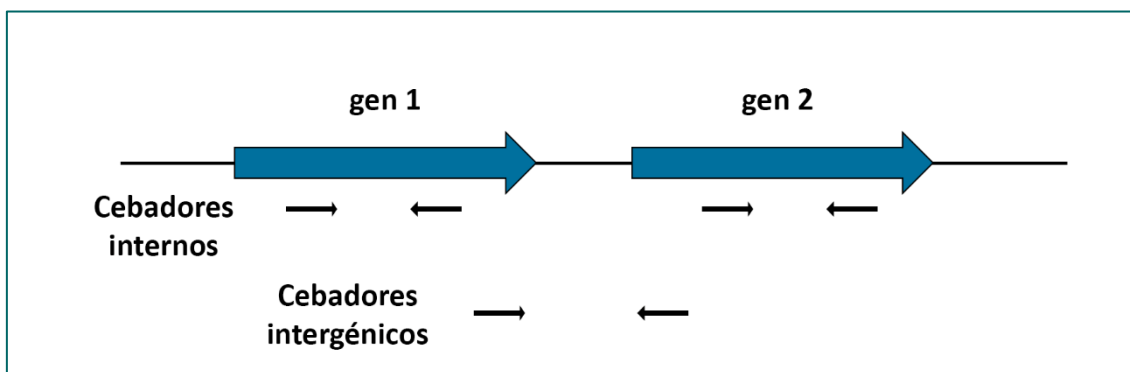


Figura 13. Esquema de los diferentes cebadores empleados en RT-PCR.

Tabla 4. Cebadores empleados en experimentos de RT-PCR.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	pb	T _m (°C)
qlpsL-F	AATCCGAAGGCTTACGTC	18	53
qlpsL-R	TCGGCAAATGGTATCTTC	18	50

qrkpK-F	TATCGCCCCTTGTATCTG	18	51
qrkpK-R	ACGTTGGCTCCTACCTTT	18	54
LK-F	CCTGCGGAAACCATTGCC	18	58
LF-R	AAACGAGGCCGACATAGC	18	56
lpsBE-F*	GGTGCGGCCACATTCATGGA	20	62
lpsBE-R*	GCGATCGAGCGAATCGCCAA	20	62

* Referencia: Margaret *et al.* (2013).

1.10.11. Mutagénesis *in vitro* por delección mediante PCR solapante

Esta técnica está basada en el método de Griffiths y Long (2008), con algunas modificaciones. Se realizaron los siguientes pasos de amplificación por PCR:

1.-Amplificación de fragmentos de entre 500 a 700 pb de longitud, de las regiones flanqueantes al gen que se desea mutagenizar. Para ello, se añadió en un volumen de 20 µL: 10 ng de ADN genómico, 0,2 µM de cada cebador (cebadores 1 y 2 para la PCR de la región flanqueante derecha y cebadores 3 y 4 para la PCR de la región flanqueante izquierda; **Tabla 5**), 0,2 mM de dNTPs y 0,1 U de una polimerasa de alta fidelidad. Se siguió el esquema general descrito anteriormente para la programación del termociclador.

2.- PCR solapante usando como ADN molde ambos productos amplificados en el paso anterior. A la mezcla de 20 µL de reacción se le añadió una concentración de 2 ng de cada fragmento de ADN molde, 0,2 µM de los cebadores 1 y 4, 0,2 mM de dNTPs y 0,1 U de la polimerasa. Esta PCR comenzó con dos ciclos en los que las temperaturas de desnaturalización y polimerización fueron menores que la que se establece en el esquema general. De esta forma se favoreció que los dos fragmentos que se usaron como ADN molde se mantuvieran unidos. A continuación, las muestras se sometieron a 35 ciclos siguiendo el esquema de PCR que se describe anteriormente (apartado 1.10.9). Un esquema de este método de delección se muestra en la **Figura 14**.

El amplicón obtenido en este último paso, que contiene las regiones que flanquean el gen que se pretende deleccionar, se cortó con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III y se clonó en el plásmido pK18mobsac. El plásmido obtenido se introdujo por transformación en *E.*

coli, y desde esta bacteria se transfirió por conjugación *S. fredii* HH103 para obtener la correspondiente estirpe mutada por delección mediante doble recombinación y selección en medio suplementado con la concentración de sacarosa adecuada.

Tabla 5. Cebadores utilizados en esta Tesis para amplificar fragmentos de ADN para la mutagénesis in vitro por delección mediante PCR solapante.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	pb	Tm (°C)
mucR1-A HindII	ATTA <u>AAGCTT</u> GATGGGCACGCTCGTCATTG	29	60
mucR1-B	CCGGGCAGGTCCGTACTTTGCGGTTACT	28	46
mucR1-C	AGTAACCGCAAAGTACGGACCTGCCCCGG	28	57
mucR1-D BamHI	AAAGGATCCGACCCGGTCCTGACCTTCGA	29	62
flaA	AATA <u>AAGCTT</u> CCTGGTGATCGACCTCATC	28	55
flaB	TCCTCGTTCATGTCCATACCAGCATAGG	28	40
flaC	CCTATGCTGGTATGGACATGAACGAGGA	28	43
flaD	AAAGGATCCGTCATCTCTGGCATGGTC	28	54

1.10.12. Transferencia por conjugación de derivados del plásmido pK18mobsac

La construcción de mutantes por delección (sección 1.10.11) se llevó a cabo utilizando el plásmido pK18mobsac. Las estirpes de *Sinorhizobium*, obtenidas por el método anteriormente descrito, sensibles a sacarosa y resistentes a Km (simples recombinantes), se inocularon en TY y se incubaron durante alrededor de 4 días en agitación a 28°C. Transcurrido ese tiempo, se sembraron alícuotas de 100 µL, provenientes de diluciones seriadas del cultivo crecido, en placas de TY con sacarosa y se incubaron a 28°C. Una vez que las colonias resistentes a sacarosa crecieron, se sembraron con palillos de dientes en placas que contenían o no Km. De esta forma se detectaron posibles dobles recombinantes (sacarosa resistentes y Km sensibles).

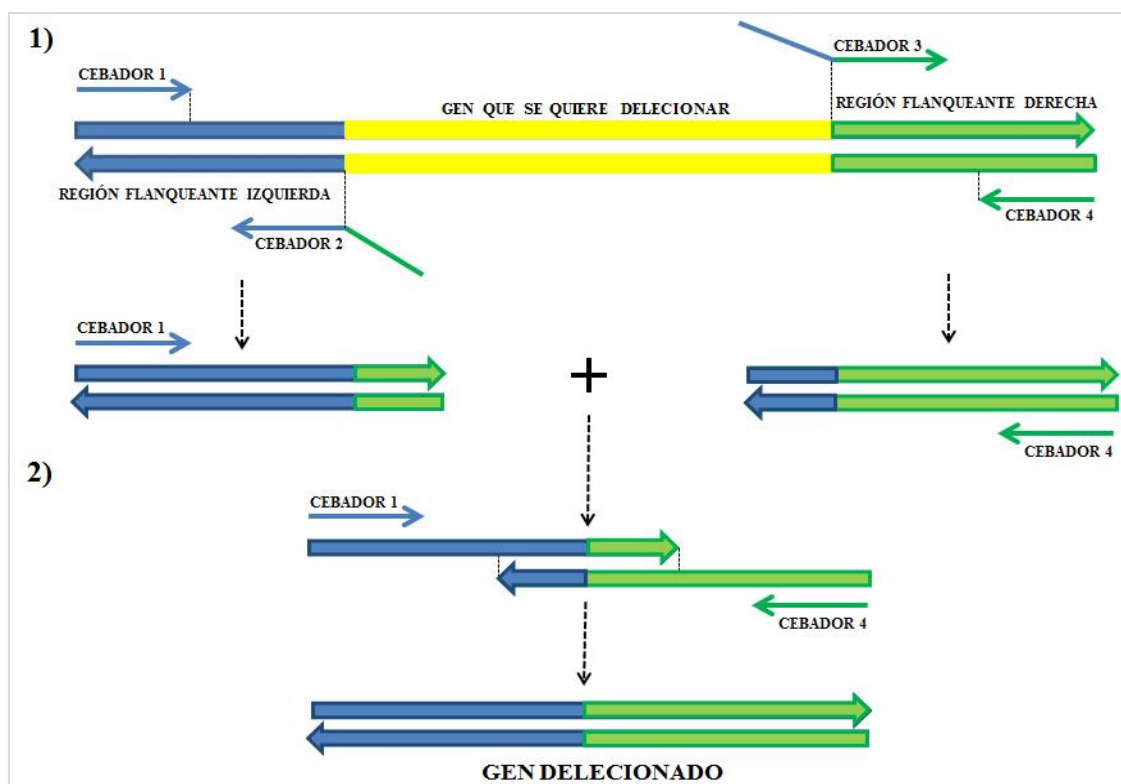


Figura 14. Esquema de la mutagénesis in vitro por delección mediante PCR solapante.

1.10.13. Hibridación ADN:ADN

Se empleó un sistema no radiactivo que se basa en el marcaje al azar de ADN con digoxigenina-UTP y la detección de los híbridos ADN:ADN-digoxigenina mediante enzimoimmunoensayo. Para esta detección se utilizó un anticuerpo conjugado (antidigoxigenina conjugado con la enzima fosfatasa alcalina). El resultado de la hibridación se obtuvo por reacción colorimétrica en el mismo filtro de hibridación.

1.10.13.1. Transferencia del ADN a filtros de nylon

Una vez realizada la electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos de ADN, junto con el marcador de peso molecular marcado con digoxigenina (Roche, Suiza), se transfirieron a filtros de nylon (Southern, 1975) Hybond-N (Amersham Biosciences, UK). Para ello, el gel, inmediatamente después de la electroforesis, se sumergió en HCl 0,25M durante 20 minutos con agitación suave. Posteriormente, se lavó con agua destilada y se mantuvo en una solución de desnaturalización durante 30 minutos en agitación. La transferencia del ADN a los filtros se realizó por presión durante aproximadamente 15 horas en presencia del tampón de transferencia alcalino. Transcurrido ese tiempo, los

filtros se lavaron en SSC 2X durante 5 minutos. Finalmente, el ADN se fijó al filtro por exposición a la luz ultravioleta durante 2 minutos.

Soluciones empleadas

SSC 20X	NaCl 2,1M, citrato de sodio 0,3M. Ajustar el pH a 7
Solución de desnaturalización	NaCl 1,5M, NaOH 0,5M
Tampón de transferencia alcalino	NaCl 1,5M, NaOH 0,25M

1.10.13.2. Marcaje de la sonda

El marcaje de la sonda se realizó mediante una PCR en la que se añadió a la mezcla normal de PCR, 1 μ L de dNTPs 10X que contiene UTP marcado con digoxigenina.

1.10.13.3. Hibridación de la sonda al ADN del filtro

Al filtro de nylon se le añadió la solución de pre-hibridación (entre 1 y 10 mL, dependiendo del tamaño del filtro), que contenía esperma de salmón (100 μ g mL⁻¹) previamente desnaturalizado por calor (95°C durante 10 minutos y 5 minutos en hielo). El filtro se pre-hibridó con esta solución incubándolo de 2 a 6 horas a 42°C (en condiciones de homología entre la sonda y la muestra a hibridar). Transcurrido este tiempo, se retiró la solución de pre-hibridación y se añadió la sonda, previamente desnaturalizada por calor (95°C durante 10 minutos y 5 minutos en hielo) y diluida en 2,5 mL de solución de pre-hibridación. El filtro se incubó con esta nueva solución durante toda la noche a 42°C.

Transcurrido este tiempo se procedió a lavar el filtro. Se lavó dos veces con una solución de SSC 2X, SDS 0,1% durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavó otras dos veces con SSC 1X, SDS 0,1% durante 5 minutos a temperatura ambiente y, por último, se realizaron dos lavados más con SSC 0,1X, SDS 0,1% durante 15 minutos a 68°C.

Soluciones empleadas

SSC 20X	NaCl 2,1M, citrato de sodio 0,3 M. Ajustar el pH a 7
SDS 20% ^a	SDS 200 g L ⁻¹
Solución de prehibridación ^b	100 mL SSC 20X (v/v), 0,4 mL SDS 20% (m/v), 100 mL H ₂ O, 20 g de reactivo de bloqueo (Roche), 0,4 g N-laurilsarcosina

^a Calentar 800 mL de agua destilada, añadir el SDS, ajustar el pH a 7,2 y enrasar a 1 L con agua destilada.

^b Disolver el reactivo de bloqueo con agitación magnética y calor y añadir el mismo volumen de formamida desionizada. Se almacena a -20°C.

1.10.13.4. Detección inmunológica

Después de realizar los lavados, el filtro se incubó durante 5 minutos en 100 mL de tampón 1 a temperatura ambiente y en agitación, para eliminar los restos de SDS. Posteriormente, los filtros se introdujeron en bolsas de hibridación junto con 10 mL de tampón 2 y se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. A continuación, se retiró el tampón 2 y se cambió por una nueva solución de tampón 2 que contenía el anticuerpo anti-digoxigenina en una proporción de 1:5000 (v/v). El filtro se incubó en esta solución durante 45 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Para eliminar el anticuerpo no fijado, el filtro se extrajo de las bolsas y se lavó dos veces durante 15 minutos en 100 mL de tampón 1 a temperatura ambiente con agitación. Finalmente, el filtro se equilibró en 50 mL de tampón 3 durante 5 minutos. Para visualizar el resultado se usó un método colorimétrico que consiste en introducir los filtros en bolsas de hibridación herméticamente selladas junto con una solución de revelado. Las bolsas se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad hasta que el resultado de la hibridación fuera claramente visible. Posteriormente los filtros fueron lavados con agua destilada y se secaron al aire.

Soluciones empleadas

Tampón 1	Tris-HCl 100 mM pH 8 y NaCl 150 mM
Tampón 2	Reactivo de bloqueo al 2% (m/v) disuelto en tampón 1

Tampón 3 Tris-HCl 80 mM pH 9,5, NaCl 100 mM y MgCl₂ 50 mM

Solución de revelado 66 µL de solución NBT (75 mg mL⁻¹ de nitroazul tetrazolio en dimetilformamida al 70%), 66 µL de solución BCIP (50 mg mL⁻¹ de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato en dimetilformamida al 100%) en 10 mL de tampón 3

* Disolver el reactivo de bloqueo con agitación magnética y calor. Almacenar a 4°C.

1.10.14. Secuenciación del ADN

La secuenciación del ADN se llevó a cabo en los servicios de secuenciación de la empresa STAB VIDA (Portugal).

1.10.15. Análisis informático de secuencias de ADN

Para el análisis informático básico de las secuencias de ADN se empleó el programa de comparación de secuencias BLASTn disponible en la página web del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi). Para otro tipo de análisis de las secuencias de nucleótidos se utilizaron las aplicaciones informáticas disponibles en la página web deambulum (<http://bioinfo.hku.hk/services/deambulum/english/prog2.html#TRAD>).

Para la búsqueda de secuencias consenso de las cajas *mucR* de los genes que pudieran estar regulados por MucR1 se usó la aplicación *fuzznuc* del paquete de bioinformática EMBOSS (<http://www.bioinformatics.nl/emboss-explorer/>).

1.10.16. Cuantificación de la expresión de genes bacterianos

1.10.16.1. PCR cuantitativa (qPCR)

Una de las estrategias seguidas para cuantificar la expresión de genes bacterianos fue realizar experimentos de qPCR a partir de los ARNm de dichos genes, previamente retrotranscritos a ADNc. Para ello, se siguieron los siguientes pasos:

- 1) Extracción del ARN total bacteriano en las diferentes condiciones experimentales a estudiar.
- 2) Retrotranscripción del ARN total a ADNc.
- 3) Realización de la PCR cuantitativa.

Para la extracción del ARN total, se incubaron los cultivos de las estirpes de *S. fredii* a estudiar en medio YM (suplementado con flavonoides cuando fue necesario) a 28°C a 180 r.p.m. hasta que alcanzaron una D.O. a 600 nm de 0,5-0,8. La extracción del ARN bacteriano se realizó utilizando los kits *RNAeasy kit* (Qiagen, Alemania) y *High pure RNA isolation kit* (Roche, Suiza), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. El ARN obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro adecuado para pequeños volúmenes (μ L): *Thermo Scientific NanoDrop* (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Para comprobar la integridad del ARN, éste se sometió a electroforesis en gel de agarosa, se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó con luz UV. Para ello, se añadieron 1-2 μ l de la solución con ARN (según la concentración) a 2 μ l de tampón de carga con bromuro de etidio. La mezcla se cargó en un gel de agarosa compuesto por agarosa al 1,4% (m/v), tampón MOPS 4X, formaldehído como agente desnaturalizante y agua. La electroforesis se llevó a cabo durante 15 minutos a 120V en tampón MOPS 1X.

La retrotranscripción se llevó a cabo utilizando el kit *PrimeScript RT reagent* (Takara, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc obtenido se utilizó como molde para llevar a cabo reacciones de qPCR utilizando los cebadores específicos adecuados (**Tabla 6**) y usando un programa que siguen el siguiente esquema común:

1. Desnaturalización del ADN a 95°C durante 10 minutos.
2. Desnaturalización del ADN a 95°C durante 30 segundos.
3. Unión de los cebadores al ADN de cadena simple a la temperatura recomendada por el fabricante (IDT) durante 30 segundos.
4. Polimerización del ADN a 72°C durante 20 segundos.
5. Lectura de la fluorescencia.
6. Repetición del paso 2 al 5, durante 40 ciclos.
7. *Melting curve* o curva de fusión desde 60 a 95°C.

El volumen de la mezcla fue de 20 μ l. Las mezclas de reacción contenían los cebadores necesarios para cada reacción a una concentración de 0,3 μ M y 5 μ l de FastStar SYBR Green Master (Roche).

Para la obtención del *Fold Change* se usaron al menos tres muestras biológicas con tres réplicas cada una en cada condición. Con todo ello se calculó el *Fold Change* usando el método $\Delta\Delta C_t$ (Pfaffl *et al.*, 2002).

Los cebadores utilizados para ensayos de *qPCR* (**Tabla 6**,) se diseñaron teniendo en cuenta que la longitud del amplicón estuviera comprendida entre 140 y 180 pb. Asimismo, para asegurar una eficiencia adecuada se eligieron amplicones que no mostrasen estructuras secundarias a la temperatura de apareamiento de los cebadores. Como ejemplo, a 55°C (temperatura de apareamiento de la mayoría de cebadores usados para *qPCR*), el dG debe ser superior (más positivo) a -8 kcal/mol.

En ambos casos, los cebadores se diseñaron manualmente o utilizando el programa informático ApE A Plasmid Editor (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape>), procurando que tuvieran las siguientes características:

- a. El porcentaje de G + C estuviera comprendido entre 55-65%
- b. La temperatura de fusión (T_m) estuviera comprendida entre 55-65°C.
- c. El no auto-apareamiento de los cebadores.

Tabla 6. Cebadores utilizados en esta Tesis para ensayos de *qPCR* de genes de *S. fredii* HH103.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	pb	T_m (°C)
rt-16S-F2	GATACCCTGGTAGTCCAC	18	51
rt16S-R2	TAAACCACATGCTCCACC	18	53
rt-exoA-F2	CATCTGGATGACCGACAG	18	53
rt-exoA-R2	GCTTGAGGATGTTCTTCG	18	51
rt-exoK-F	CGATTTCGAGGTGCTTGG	18	54
rt-exoK-R	TCCTTCTCCCAGACGAAG	18	54
exoY2rt-F	ATCGGGTACTGCAGGAAT	18	54
exoY2rt-R	GCGAATGATGTTGAGGAG	18	51
qnodA-F	CGTCATGTATCCGGTGCTGCA	21	61

qnodA-R	CGTTGGCGGCAGGTTGAGA	19	61
exoRrt-F	GCTTAGGATGGCGGTACT	18	55
exoRrt-R	CGCTCTTGTAAGCGGAGA	18	55
qndvA-F	CTTCAGTATCTTGCTGTCCA	20	53
qndvA-R	GATACGGTTGTAGCTGTGA	19	52
qd_604 F	CGGATTATCGTGGGCTTC	18	53
qd_604 R	GCAGCAGTCATCTCATCG	18	54
qd_448-F	ACTCTCAAGAGCAGGATTAGG	21	55
qd_448-R	ACCATCGGGAGTAGTATCAGT	21	56
d118q-F	TATGAGCTTAACGACGGATCT	21	54
d118q-R	TATATGAACTTGCGACACCAG	21	54
qd_257-F	ACAGACAGCTAAATTCTCTGC	21	54
qd_257-R	GATGTTGTCATCCTCTGGATA	21	53
qd_208-F	GATCTCAGGCTTTCACAGAC	20	54
qd_208-R	CGTCCTCTGACGGTTTCATG	20	56
d373q-F	TCGACGATTCAATAAGGGTG	20	53
d373q-R	CATATCCTCTCCGCAATAGC	20	53
rtmucR2-F	TGACAGAAACCACGCTCG	18	56
rtmucR2-R	TCGGCTTCTCAATGGGAG	18	55
qfliG F	ACGTTCCAGTCCTACGAG	18	54
qfliG R	TCATCGACAGGACATAGG	18	51
qcheW1 F	TGCGTCAACATCATGTCC	18	54
qchew1 R	CGACGATGATGACGTGAC	18	53

q03584 F	GAACGGACAAAGCCCTAC	18	54
q03584 R	AATGTTGCGAGGTCGGTG	18	56
q06390F	GCAAGGGAAGGCATACTG	18	54
q06390R	CAGATCAATCCTGCGTCC	18	53
rtrem-F	ACACCGTCGCTCGAAAAC	18	56
rtrem-R	ACCTCGCCGTTGATCTCC	18	58
q02569 F	ATGCTCACGAAGACCGAC	18	55
q02569 R	ATGACCAGGCTTACGTCG	18	55
q02172 F	TCTGAGGTTGCGCACATTC	18	53
q02172 R	GGTCCGTGATTGGATCTC	18	53
qfbpA F	CACCTACGAGGAACTTGC	18	53
qfbpA R	TTGGAGAGATTGTCCCTG	18	52
qftsZ1 F	ATACGCTGATCGTCATCC	18	52
qftsZ1 R	GCCTTCCTTGACCATGAG	18	53
qlpsL-F	AATCCGAAGGCTTACGTC	18	53
qlpsL-R	TCGGCAAATGGTATCTTC	18	50
qrkpK-F	TATCGCCCCTTGTATCTG	18	51
qrkpK-R	ACGTTGGCTCCTACCTTT	18	54

Soluciones empleadas

MOPS 4X	MOPS 80 mM, AcNa 20 mM, EDTA 4 mM
---------	-----------------------------------

* Almacenar en oscuridad, el MOPS es sensible a la luz y al calor.

1.10.16.2. Medida de fluorescencia de fusiones promotor-Green Fluorescent Protein (GFP)

La medida de la emisión de fluorescencia por parte de la GFP se llevó a cabo para cuantificar la expresión de los genes a través de una fusión transcripcional compuesta por la región promotora del gen a estudiar más el primer codón de la región codificante y el gen que codifica para la proteína GFP. Para llevar a cabo la cuantificación de la fluorescencia se realizó el método descrito por McIntosh (2008) pero con algunas modificaciones.

Las estirpes que portan la fusión, se cultivaron en YM suplementado con antibióticos hasta alcanzar la fase exponencial. Posteriormente, se reinocularon los cultivos y se incubaron a 28°C hasta que alcanzaron una D.O.₆₀₀ de 0,5-0,6. Los cultivos se diluyeron hasta una D.O.₆₀₀ de 0,04, se dispusieron alícuotas de 100 µl en placas multipocillos y se incubaron durante 48 horas a 28°C. La D.O. de los cultivos y la fluorescencia de la GFP (excitación de 485 nm y emisión de 528 nm con un 35% de sensibilidad) se midieron usando un lector Tecan Infinite M200 (Tecan Trading AG). Por último, se realizó el cociente entre la medida de fluorescencia y la D.O. del cultivo.

Se realizaron dos experimentos independientes por duplicado y en cada réplica se usó la medida de al menos seis pocillos. Como valor de fondo se usó la estirpe silvestre (SVQ269) portando el plásmido pPHU231.

Tabla 7. Cebadores para la realización de la construcción promotor-GFP.

Nombre	Secuencia (5'- 3')	pb	Tm (°C)
PmucR1-F HindIII	ACGGA <u>AAGCTT</u> TTGCGGCATTTCTGATTCTG	30	55
PmucR1-R XbaI	TATT <u>TCTAGAC</u> ATTTTTTTCTCCTATCGGA	30	49

1.10.16.3. Medida de la actividad β -Galactosidasa

La determinación de la actividad β -Galactosidasa se emplea para cuantificar la expresión de un gen cuando el promotor dicho gen se fusiona con el gen lacZ o cuando se ha insertado un casete con una copia de lacZ carente de promotor dentro del gen en cuestión. Para medir esta actividad se sigue el método descrito por Miller (1972).

Se inocularon tubos con 3 mL de YM líquido a partir de cultivos bacterianos en fase exponencial y se incubaron hasta alcanzar una D.O.₆₆₀ entre 0,15 y 0,3.

Posteriormente se mezclaron en un tubo 200 µL de cultivo, 800 µL de tampón Z, 20 µL de cloroformo y 10 µL de SDS 0,1% (m/v) en H₂O. La mezcla se agitó mediante *vortex* durante 15 segundos y se añadió 200 µL de ONPG (orto-nitrofenil-β-d-galactopiranosido) preparado a 4mg/mL de tampón Z. Se agitó mediante *vortex* y se incubó a 28°C en agitación mientras dura la inducción (hasta que la mezcla adquirió una coloración amarillenta). La reacción se detuvo añadiendo 500 µL de Na₂CO₃ 1M a la reacción. Por último, se cuantificó la D.O.₄₂₀ de cada tubo.

La actividad β-Galactosidasa se calculó mediante la siguiente fórmula donde el tiempo es el transcurrido desde la adición del ONPG hasta que se detiene la reacción.

Actividad β-Galactosidasa (Unidades Miller)	=	$\frac{\text{Volumen final (mL)} \times \text{D.O.}_{420\text{nm}} \times 1000}{\text{Volúmen del cultivo (mL)} \times \text{tiempo (min)} \times \text{D.O.}_{660\text{nm}}}$
--	---	--

Soluciones empleadas

Tampón Z	Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O 104 mM, NaH ₂ PO ₄ H ₂ O 45 mM, KCl 10 mM, MgSO ₄ 7H ₂ O 1 mM.
----------	--

Completar hasta 1L y ajustar el pH a 7,0.

1.10.16.4. RNA-Seq

Condiciones de cultivo, extracción de ARN y secuenciación

Las estirpes a estudiar se crecieron a 28°C en medio YM, con o sin genisteína, hasta que alcanzaron la fase estacionaria (D.O.₆₀₀ de 1,2 aproximadamente). El ARN total se extrajo del mismo modo que se ha descrito en la sección 1.10.16.1 y posteriormente se verificó la calidad y la cantidad del ARN mediante un *Nanodrop* 1000 (Thermo Scientific) y un fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen). En total se extrajeron dos muestras independientes por cada condición.

Secuenciación de ARN

El ARN ribosómico (ARNr) se eliminó usando el kit MICROB Express Bacterial mRNA Purification (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de eliminar el ARNr, se comprobó la integridad y la calidad del ARN mediante Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). La secuenciación del ARN se llevó a cabo por la empresa Sistemas Genómicos (https://www.sistemasgenomicos.com/web_sg/), mediante el uso de la tecnología Next Generation Sequence (NGS) platform Illumina y el secuenciador Illumina HiSeq 2000 (Illumina). Las muestras de ARN empobrecidas en ARNr se usaron para generar librerías completas del transcriptoma siguiendo las instrucciones del fabricante para la secuenciación mediante la plataforma NGS. La calidad del ADNc se analizó mediante el kit Bioanalyzer 2100 DNA 1000 (Agilent Technologies) y se cuantificó usando un fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen).

Mapeo de los datos del RNA-Seq

Las lecturas obtenidas por secuenciación del transcriptoma completo se mapearon frente a la última versión del genoma de *S. fredii* HH103 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000283895.1/) usando el *algoritmo Life Technologies mapping algorithm* versión 1.3 (<http://www.lifetechnologies.com/>). Las lecturas de baja calidad se eliminaron usando el software *Picard Tools* version 1.83.

Estimación de los genes diferencialmente expresados

La predicción génica se estimó usando el método *cufflinks* (Trapnell *et al.*, 2010) y los niveles de expresión se calcularon usando el software *htseq*, versión 0.5.4p3 (Anders y Huber, 2010). Este método elimina las lecturas multi-mapeadas, considerando para la expresión génica solamente las lecturas únicas. El método *edge* versión 3.2.4 se aplicó para el análisis de la expresión diferencial entre las condiciones (Robinson *et al.*, 2010). Este método usa un modelo de *Poisson* para estimar la varianza de los datos de RNA-Seq para la expresión diferencial, y depende de diferentes procesos de normalización basados en la rigidez de las muestras, la composición en GC y la longitud de los genes. Los genes diferencialmente expresados se definieron como aquellos genes con un *fold-change* menor y mayor que -3,5 ó 3,5 respectivamente, y con un valor de *p* inferior a 0,05.

1.11. Técnicas relacionadas con las proteínas

1.11.1. Cuantificación de proteínas

Se utilizó el método descrito por Bradford (1976). Para determinar la concentración de proteínas de una muestra se mezclaron 500 μL de agua destilada con 500 μL de la solución Bradford (Sigma, EEUU) y 5 μL de la muestra y se midió la D.O. a 595 nm. El valor de la concentración aproximada de las proteínas de la muestra ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se obtuvo a partir de una recta patrón, dividiendo el valor obtenido entre el factor de dilución. Otro método de cuantificación fue mediante el uso de un espectrofotómetro *Thermo Scientific NanoDrop* (Thermo Fisher Scientific, EEUU).

1.11.2. Electroforesis unidireccional de las proteínas

La electroforesis unidireccional se realizó en condiciones desnaturalizantes, que separa las proteínas según su masa molecular, siguiendo el método descrito por Laemmli (1970).

Las proteínas se resuspendieron en tampón de muestra 1X, se calentaron a 100°C durante 5 minutos y se mantuvieron en hielo. Posteriormente, las muestras se centrifugaron y el sobrenadante obtenido se cargó en el gel junto con el marcador de masa molecular de amplio rango suministrado por Bio-Rad (EEUU) o Fermentas (Thermo Fisher Scientific, EEUU).

Se prepararon geles de separación de distinta concentración de acrilamida dependiendo del tamaño de las proteínas que se querían separar. Así, se utilizaron geles del 12% de acrilamida para separar proteínas de mayor tamaño y geles del 15% para separar proteínas más pequeñas. Posteriormente, los geles inmersos en tampón de electroforesis 1X se corrieron a 150 V en cubetas Mini Protean II y Protean II (Bio-Rad, EEUU), hasta que el colorante alcanzó el borde inferior del gel. En todos los casos se utilizaron geles de empaquetamiento al 4% de acrilamida

Gel de separación:			Gel de empaquetamiento:	
	12%	15%		4%
Acrilamida/bisacrilamida 40% 29:1	9 mL	11,25 mL	Acrilamida/bisacrilamida 40% 29:1	750 µL
H ₂ O destilada	13,05 mL	10,8 mL	H ₂ O destilada	4,7 mL
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	7,5 mL	7,5 mL	Tris-HCl 0,5M pH 6,8	1,89 mL
SDS 10% (m/v)	300 µL	300 µL	SDS 10% (m/v)	75 µL
APS 10% (m/v)	125 µL	125 µL	APS 10% (m/v)	37,5 µL
TEMED	15 µL	15 µL	TEMED	7,5 µL

NOTA: los volúmenes indicados son los adecuados para geles de 17 x 17 cm.

Solución empleada

Tampón de electroforesis	Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% (m/v) pH 8,3
--------------------------	---

1.11.3. Tinción de las proteínas con azul de Coomassie

En primer lugar, las proteínas del gel se fijaron con una solución compuesta por isopropanol al 25% y ácido acético glacial al 10%. Posteriormente, se lavó el gel en abundante agua bidestilada durante 5 minutos en agitación suave. Este paso se repitió dos veces más. A continuación, el gel se sumergió en la solución PageBlue Protein Staining Solution [Fermentas (Thermo Fisher Scientific, EEUU)] durante, al menos, una hora en agitación. Por último, se lavó el gel con agua bidestilada durante, al menos, 5 minutos.

1.11.4. Inmunodetección de las proteínas

Una vez realizada la electroforesis en un gel de poliacrilamida, las proteínas se transfirieron a filtros de nitrocelulosa o a membranas de polivinilo de difluoruro o PVDF. Para ello se utilizó el aparato de transferencia húmeda *Mini Trans-Blot electrophoretic transfer cell* (Bio-Rad, EEUU). Antes de la transferencia, tanto el gel como la membrana se sumergieron en el tampón de transferencia durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizó la transferencia de los péptidos desde el gel a la membrana utilizando

un voltaje de 100 V durante 60 minutos. En el caso de las membranas de PVDF, éstas se deben activar previamente mediante inmersión durante unos segundos en metanol.

Para comprobar que la transferencia se había realizado correctamente, la membrana se tiñó con rojo Ponceau durante 3 minutos. Posteriormente, se lavó con agua destilada hasta que las bandas correspondientes a proteínas se observaron nítidamente y se dejó secar. La membrana así seca se puede almacenar hasta su uso o bien continuar con la inmunodetección. En el caso de que se almacenasen, las membranas de PVDF deben volver a activarse mediante su inmersión en metanol.

La membrana se sumergió en tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Transcurrido este tiempo, se añadió el anticuerpo primario en una dilución 1:2500 y se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Después se lavó vigorosamente la membrana con TBST durante unos segundos y posteriormente se lavó con abundante TBST cuatro veces en agitación durante 15 minutos. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario 1:7500, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave y se volvió a lavar como en el paso anterior. La membrana se sumergió en tampón 3 durante 5 minutos y se reveló usando NBT-BCIP (nitroazul de tetrazolio-fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indoil).

Soluciones empleadas

Tampón de transferencia húmeda	Tris 25 mM pH 8,3*, glicina 192 mM, etanol absoluto 20% (v/v)
Rojo Ponceau	Rojo Ponceau 0,1% (m/v) en ácido acético glacial 5% (v/v)
TBS 10X	Tris 0,2 M, NaCl 1,3 M. Ajustar el pH a 7,6
Tampón de bloqueo	TBS 1X, BSA 2% (m/v)
TBST	TBS 1X, Tween-20 0,1% (v/v)
Tampón 3	Tris-HCl 80 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl ₂ 50 mM

Solución de color	45 μL de solución NBT (75 mg mL^{-1} de nitroazul de tetrazolio en dimetilformamida al 70%), 35 μL de solución de BCIP (50 mg mL^{-1} de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato en dimetilformamida al 100%) en 10 mL de tampón 3
-------------------	--

* no ajustar el pH.

1.11.5. Ensayo de retardo en gel (EMSA)

1.11.5.1. Expresión y purificación de proteínas de fusión a la Glutación S-Transferasa (GST)

Expresión de proteínas de fusión unidas a GST

La expresión de proteínas unidas a GST se realizó mediante el método descrito por Sambrook y Russell (2001).

Se usó una fusión en fase del gen *mucR1* con la proteína GST (usada como etiqueta o *tag*) en el plásmido de expresión pGEX-KG, de tal modo que GST queda unida a MucR1 por el extremo N-terminal. Esta fusión se introdujo en la estirpe *E. coli* BL21, ya que posee unos niveles de proteasas más bajos que otras estirpes de *E. coli*. A continuación, se llevó a cabo el protocolo de expresión:

Se preinoculó una colonia de *E. coli* BL21, con el plásmido de expresión que porta los genes que codifican para la proteína de fusión, en 5 mL del medio LB suplementado con los antibióticos adecuados y se incubó a 37°C en agitación durante toda la noche. Una vez crecido el cultivo, se usaron los 5 mL para inocular 100 mL del mismo medio y se incubó a 37°C en agitación hasta que la D.O.₆₀₀ alcanzó un valor aproximado de 0,8. Posteriormente, se añadió *isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido* (IPTG) a una concentración final de 100 mM para inducir la expresión de los genes que codifican para la proteína de fusión. El cultivo se incubó a 28°C en agitación durante al menos cuatro horas.

Transcurrido este tiempo, se dividió el volumen en dos tubos Falcon de 50 mL y se centrifugó a 2500 *g* a 4°C durante 20 minutos. A continuación, se descartó el sobrenadante, el pellet se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Purificación de proteínas de fusión unidas a GST

Se siguió el método descrito por Smith y Johnson (1998), con ciertas modificaciones. El pellet, congelado en el tubo Falcon de 50 mL, se resuspendió en 3 mL de tampón de extracción con 5 mM de ditioneitol (DTT). Además, se añadieron una serie de inhibidores de proteasas para *E. coli*, como quimiostatina, leupeptina y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), a las concentraciones de 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 1 mM, respectivamente. El pellet resuspendido se incubó en hielo durante 10 minutos. Tras la incubación, se sonicó durante 6 minutos mediante ciclos de 20 segundos de sonicación y 10 segundos de pausa. El tubo Falcon se mantuvo en todo momento en hielo para evitar la degradación de las proteínas de la muestra. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 10000 *g* durante 15 minutos a 4°C. Tras la centrifugación, se crearon dos fases: la fase soluble, la cual contiene la proteína de estudio, y la insoluble, que corresponde a las membranas de la bacteria y las proteínas ancladas a ésta.

A continuación, se añadió 1 mL del sobrenadante obtenido anteriormente a una columna con la resina Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare, Reino Unido), previamente preparada y equilibrada. Para el equilibrado de las columnas, se añadieron en un tubo eppendorf 133 μL de la resina Glutathione Sepharose 4B y 1,4 mL de tampón fosfato (PBS) 1X frío. La columna se centrifugó a 500 *g* durante 5 minutos a 4°C descartando el sobrenadante y teniendo especial cuidado de no dejar seca la resina. Posteriormente, se añadió a la resina 100 μL de tampón de extracción frío con los inhibidores de proteasas a las concentraciones previamente descritas

La columna ya equilibrada se incubó durante, al menos, una hora en agitación a 4°C. Tras la incubación, se centrifugó a 500 *g* durante 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante.

Posteriormente, se lavó la columna para retirar las proteínas que no estuvieran unidas a la resina, es decir, las que no son proteínas de fusión a GST. Para ello, se añadieron 500 μL del tampón de lavado con 5 mM DTT, se centrifugó a 500 *g* durante 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Este paso se repitió, al menos, dos veces más.

Por último, se eluyó la proteína de estudio añadiendo 50 μL de tampón de elución. Este tampón contiene glutatión, molécula que tiene más afinidad por la resina que la propia

GST. La columna se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, agitando suavemente el tubo eppendorf cada cierto tiempo para que la proteína de fusión a GST se desprendiera de la resina con mayor facilidad. Transcurrido este tiempo, la columna se centrifugó a 500 g durante 5 minutos a 4°C y el eluyente se conservó a -20°C hasta su uso. Este paso se repitió dos veces más obteniéndose tres volúmenes de elución. Cada uno de los eluyentes se cuantificó usando el espectrofotómetro *Thermo Scientific NanoDrop* (Thermo Fisher Scientific, USA) y posteriormente se verificó que la expresión y purificación de las proteínas se había llevado a cabo correctamente mediante un gel de acrilamida de proteínas SDS-PAGE, visualización mediante *PageBlue* (Thermo Fisher Scientific) y posterior inmunodetección usando anticuerpos contra GST (Cell Signaling, Product #2625) como se ha descrito en las secciones 1.8.2-4.

Soluciones empleadas

Tampón de extracción	Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, Tritón X-100 0,02%, Tween 20 0,05%, EDTA 5 mM, EGTA 1 mM
Tampón de lavado	Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, EGTA 1 mM
Tampón de elución	Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, glutatión reducido 10 mM (Sigma Aldrich, EEUU).
Tampón PBS	K ₂ HPO ₄ 100 mM, KH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 7,2

1.11.5.2. Reacción de unión entre proteína-ADN, electroforesis y toma de imágenes

Se usaron diferentes fragmentos de ADN pertenecientes a una región promotora para analizar la unión de la proteína a cada zona de dicha región. Estos fragmentos de ADN diana se amplificaron por PCR usando cebadores marcados con el fluorocromo Cy5.

Cada fragmento de ADN se mezcló con la proteína. Para ello se usaron 50 ng de ADN y cantidades crecientes de la proteína purificada marcada con GST, concretamente se usaron 0; 0,5 y 5 µg de proteínas. Esta mezcla se incubó a 20°C durante 30 minutos en el tampón de unión con un volumen final de 25 µL (que puede ser variable en función de la proteína a estudiar) y se cargó en un gel de agarosa al 1,5% en condiciones nativas, preparado en Tris-glicina pH 8,3 y pre-corrido a 4°C durante 40-60 minutos en el mismo

tampón. La electroforesis se llevó a cabo a 90V durante 2 horas a 4°C en Tris-glicina pH 8,3. Las imágenes de los geles se tomaron usando un *Typhoon 3000 variable mode imager* (Amersham Bioscience, Freiburg, Alemania)

Tabla 8. Cebadores para EMSA.

Nombre	Secuencia (5'-3')	pb	Tm (°C)
PmucR1A-F (Cy5)	TTGCGGCATTTCTGATTCTGT	21	57
mucR1A-R	GCGGTTACTGGCTTAACACTG	21	57
mucR1B-F	GTAACCGCAAAGTGTCGTCG	20	57
mucR1B-R	GATAGCCGTGCAACGGGAG	19	59
mucR1C-F	GTTGCACGGCTATCGCTCAG	20	59
PmucR1C-R (Cy5)	CTCCTATCGGAATCCAGCAAC	21	56

Solución empleada

Tampón de unión	Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 100 mM, Mg2SO4 0,1 mM, glycerol 4,5%, BSA 0,5 mg/mL
Tampón de electroforesis	Trisbase 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3

2. Material y métodos utilizados para los estudios con plantas

2.1. Plantas

Las plantas empleadas en esta Tesis están recogidas en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Plantas utilizadas en esta Tesis.

Especie	Variedad	Nombre común
<i>Glycine max</i> L. Merrill	Williams	Soja (<i>soybean</i>)
<i>Vigna unguiculata</i>	Bisbee Red	Caupí (<i>cowpea</i>)
<i>Lotus burtii</i>	Borsos	
<i>Lotus japonicum</i>	Gifu	

2.2. Soluciones nutritivas para las plantas

Para el crecimiento de las plantas se utilizó la solución de Fähræus carente de nitrógeno combinado.

Solución de Fähræus (Vincent, 1970)

CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,12 g
KH ₂ PO ₄	0,1 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O/Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,15 g/0,075 g
Citrato férrico*	1 mL
Solución de Gibson	1 mL
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

El pH del medio se ajustó a 6,5 -7,0 y posteriormente se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C). Es importante añadir primero la solución de Gibson y el citrato férrico y después añadir uno a uno el resto de componentes esperando siempre a que se disuelva antes de añadir el siguiente.

Solución de micronutrientes de Gibson

H ₃ BO ₃	2,86 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	2,08 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,08 g
Na ₂ MoO ₄	0,13 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

*El citrato férrico Se preparó disolviendo con calor 5g L⁻¹ de citrato férrico en H₂O destilada.

2.3. Desinfección y germinación de semillas

Las semillas de *G. max*, *V. unguiculata*, *L. japonicum* y *L. burtii* se desinfectaron mediante un tratamiento con etanol de 96° durante 30 segundos, seguido de otro con hipoclorito sódico al 6% (m/v) durante 6 minutos. Tras ello, las semillas se lavaron seis veces con abundante agua destilada estéril. Las semillas de *L. japonicum* y *L. burtii* se escarificaron con ácido sulfúrico 96-98% durante 10 minutos antes de su desinfección.

Las semillas desinfectadas se colocaron en placas de Petri que contenían agar-agua al 1% (m/v) y se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente o a 28°C hasta su germinación.

2.4. Inoculación y cultivo de plantas

Las semillas germinadas se transfirieron a diferentes sistemas según el experimento realizado:

2.4.1. Jarro de Leonard (Vincent, 1970)

El sistema consiste en un depósito de ~1,5 L que contiene solución de Fähræus. Sobre este depósito se colocó una maceta que contiene 800 cm³ de vermiculita mezclada con perlita [vermiculita:perlita (4:1)] y humedecidas con 250 mL de la misma solución nutritiva. La maceta y el depósito se conectaron mediante una mecha de algodón de aproximadamente 20 cm de longitud. El jarro completo se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C). En cada jarro se colocaron dos semillas (en el caso de soja y *cowpea*). En el caso de *L. japonicum* y *L. burtii* los ensayos de nodulación se realizaron en minijarro de Leonard [aproximadamente 200 cm³ de vermiculita en la parte superior y un depósito de ~200 mL que contenía la solución nutritiva]. En cada jarro se colocaron 4 semillas tanto para *L. burtii* como para *L. japonicus* GIFU. Cada semilla se inoculó con 1 mL de cultivo bacteriano crecido en medio YM y con una D.O.₆₀₀ de 0,4-0,5.

2.4.2. Sistema de hidroponía en vaso de precipitado o tubo

Alrededor de 10 semillas de *G. max* se colocaron sobre una rejilla que descansa sobre un depósito que contenía 150 mL de solución Fähræus 1X y 15 mL de un cultivo bacteriano crecido en medio YM a una D.O.₆₀₀ de alrededor de 0,8. Este sistema se encuentra en el interior de un vaso de precipitado de cristal de 2 L con tapa de cristal que contenía 100 mL de agua destilada estéril, para favorecer condiciones de alta humedad. Todos los componentes del sistema fueron esterilizados en el autoclave (20 minutos a 121°C a una atmósfera de sobrepresión) (**Figura 15**).

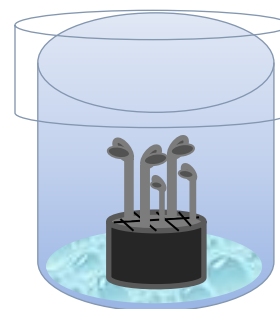


Figura 15. Sistema de hidroponía en vaso de precipitado

En el caso del sistema de hidroponía en tubos, se usaron tubos de 2,5 x 24,5 cm, se añadieron 30 mL de Fähræus 1X y se colocaron rejillas para colocar las semillas. Estos tubos se esterilizaron en autoclave y posteriormente se introdujo una semilla por tubo sobre la rejilla. Los tubos se inocularon con 1 mL de cultivo a una D.O.₆₀₀ de alrededor de 0,4-0,5, se cerraron con papel *film* y las plantas se dejaron crecer sobre unos 10 días.

Para los ensayos de epifluorescencia, los tubos contenían 100 mL de Fåhræus y una lámina cilíndrica de papel de filtro que cubría casi toda la longitud del tubo. Las plántulas de soja y *cowpea* se colocaron de forma que la radícula se dispusiese entre el papel de filtro, humedecido por la solución nutritiva, y la pared del tubo. Para evitar la evaporación, después de la esterilización se colocó un algodón estéril. Las plántulas se inocularon con 1 mL de cultivo (D.O.₆₀₀ 0,4-0,5) y se crecieron durante 14 días aproximadamente.

2.5. Ensayos de nodulación

Estos ensayos se realizaron para analizar las propiedades simbióticas de las distintas estirpes estudiadas en esta Tesis. Se llevaron a cabo en cámaras de plantas con un fotoperíodo de 16 horas de luz (con intensidad de $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 8 horas de oscuridad a 26°C y 18°C, respectivamente. En los ensayos con las plantas de soja, se mantuvieron en la cámara de plantas durante 7 semanas, 6 semanas para *cowpea*, y entre 6 y 9 semanas para *Lotus*.

Los análisis estadísticos de los resultados fueron realizados con el programa *IBM SPSS statistics 23*. Salvo que se especifique lo contrario, cada tratamiento fue individualmente comparado con el control mediante el test no paramétrico de U de Mann-Whitney.

2.5.1. Recuento del número de nódulos y estimación de su masa

Para determinar la eficiencia de nodulación se cuantificó el número de nódulos formados en cada planta. Estos nódulos se recolectaron y se pesaron en conjunto para estimar la masa individual de cada nódulo.

2.5.2. Estimación de la actividad nitrogenasa

Para ello se usó la Técnica de la Reducción del Acetileno (ARA, del inglés *Acetylene Reduction Assay*), empleándose un cromatógrafo de gases 5890A (Hewlett Packard). Esta técnica permite realizar una medida de la capacidad de la enzima nitrogenasa para reducir el acetileno a etileno, la cual es una medida indirecta de la fijación biológica del nitrógeno (Turner y Gibson, 1980).

Para llevar a cabo esta medida, la raíz de cada planta se separó de la parte aérea y rápidamente se introdujo en un frasco de 250 mL, para *G. max* y *V. unguiculata*, o en un tubo de 10 mL, para *L. burtii* y *L. japonicus*, y se selló con un tapón de goma. Con una

jeringa se extrajo la décima parte del volumen de aire del recipiente y se introdujo el mismo volumen de acetileno. Transcurrida 1 hora, se extrajeron 3 muestras de 1 mL de la atmósfera de cada frasco y se analizaron en el cromatógrafo de gases. Por último, se determinó la actividad nitrogenasa de cada raíz, empleando la siguiente fórmula:

$$\text{ARA (nanomoles etileno/planta x hora)} = \frac{\text{Área de etileno x vol. Recipiente (mL)}}{\text{Área 1 nmol etileno x tiempo (horas)}}$$

2.5.3. Secado de la parte aérea de la planta

Las partes aéreas de las plantas se secaron en una estufa para desecación (J.P. Selecta) a 80°C durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo se dejaron otras 24 horas con el horno apagado y ventilación cerrada, para evitar su rehidratación y por último se pesaron.

2.5.4. Aislamientos de las bacterias de los nódulos

Los nódulos se separaron de las raíces y se desinfectaron mediante un tratamiento con hipoclorito al 12% durante 2 ó 3 minutos. A continuación, se enjuagaron abundantemente con agua destilada y se rodaron en cajas de medio TY para comprobar que la superficie del nódulo no presentaba bacterias. Posteriormente, los nódulos se machacaron en condiciones asépticas mediante el uso de una espátula estéril y su contenido se sembró en placas de TY para obtener colonias aisladas. Una vez crecidas, distintas colonias se sembraron mediante palillo de dientes en placas de TY suplementadas con los antibióticos apropiados para identificar las bacterias aisladas del nódulo.

2.6. Visualización de primordios nodulares

Las plantas se crecieron durante 10 días en sistemas de hidroponía en tubos, se extrajeron y se cortaron las raíces. Posteriormente, las raíces se introdujeron en lejía comercial durante 20 minutos para “blanquearlas”, se lavaron con agua y se tiñeron durante 5 minutos con una solución de azul de metileno 0,1%. Una vez teñidas, se fueron destiñendo con sucesivos cambios de agua hasta que las raíces queden translúcidas y los primordios y/o raíces incipientes queden teñidas de azul. Los primordios ya teñidos

se visualizaron y fotografiaron bajo una lupa SZM-IED1 con cámara Optikam pro (Optika Microscopes, Italia).

2.7. Microscopía de Epifluorescencia

La visualización de la curvatura de los pelos radicales y la fluorescencia de las bacterias que se localizan en la superficie de la raíz se llevó a cabo mediante esta técnica y con la colaboración del Doctor Carlos Medina Morillas del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo de la Universidad Pablo de Olavide/CSIC. Para ello se obtuvieron fragmentos de 2-3 cm de raíces de plantas de 14 días y se colocaron en portaobjetos con PBS. La visualización se llevó a cabo mediante el uso de un microscopio de epifluorescencia invertido Leica DMI400 B (320x).

2.8. Microscopía confocal

La microscopía confocal se llevó a cabo para determinar el modo de infección de *S. fredii* HH103 en plantas de *L. burtii*. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Doctor Yasuyuki Kawaharada y el grupo del Profesor Jens Stougaard de la Universidad de Aarhus, Dinamarca (Department of Molecular Biology and Genetics - Plant Molecular Biology).

Además, la microscopía confocal se usó para ver las bacterias dentro las raíces de plantas de soja y *cowpea* llevando a cabo la misma metodología que para la microscopía de epifluorescencia y usando el microscopio confocal Leica SPE (200-400x). Estos experimentos se llevaron a cabo por el Doctor Carlos Medina Morillas del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo de la Universidad Pablo de Olavide/CSIC.

RESULTADOS

Capítulo I. Caracterización de la región *rkp-2* *

1. Introducción

Diversos trabajos han mostrado que el KPS juega un papel importante en la simbiosis de *Sinorhizobium fredii* y *S. meliloti* con sus plantas hospedadoras (Putnoky *et al.*, 1990; Parada *et al.*, 2006). El KPS de *S. meliloti* Rm41 está compuesto por ácido glucurónico (AGlc) y un derivado del ácido pseudoamínico (AcPse). Como se ha descrito en la introducción, se han identificado tres grupos de genes requeridos para la producción del KPS en *S. meliloti* Rm41: *rpk-1*, *rkp-2* y *rkp-3* (Kiss *et al.*, 2001). La región *rpk-1* interviene en la síntesis del lípido transportador del KPS, mientras que la región *rpk-3* interviene en la síntesis del AcPse. La región *rpk-2* está compuesta por dos genes, *lpsL* y *rkpK*, cuyos productos son responsables de la producción de ácido galacturónico y glucurónico respectivamente. Ambos genes son necesarios para la biosíntesis de LPS en *S. meliloti* Rm41, mientras que RkpK también es necesario para la producción de KPS (Kereszt *et al.*, 1998), debido a que en esta estirpe ambos polisacáridos poseen AGlc.

En el caso de *S. fredii* HH103, el KPS es un homopolímero de un derivado de AcPse. En trabajos previos de nuestro grupo se han estudiado las regiones *rpk-1* y *rpk-3* (Parada *et al.*, 2006; Hidalgo *et al.*, 2010; Margaret *et al.*, 2012; Margaret-Oliver *et al.*, 2012). Gracias a la secuenciación del genoma de *S. fredii* HH103 hemos identificado ortólogos de los genes *lpsL* y *rkpK*. En el presente capítulo se presentan los estudios llevados a cabo para caracterizar esta región.

Los resultados expuestos en este capítulo han sido publicados en la revista Plant and Soil:

Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., Crespo-Rivas, J.C., Medina, C., Murdoch, P. del S., Cuesta-Berrio, L., Rodríguez-Carvajal, M.A., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M. 2017. The *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103 *rkp-2* region is involved in the biosynthesis of lipopolysaccharide and exopolysaccharide but not in K-antigen polysaccharide production. Plant and Soil. doi:10.1007/s11104-017-3268-z

2. Resultados

2.1. Organización genética y análisis transcripcional de la región *rkp-2* de *S. fredii* HH103.

La región *rkp-2* de *S. fredii* HH103 se localiza en el cromosoma (número de acceso HE616890) y está compuesta por dos genes, *lpsL* y *rkpK* (Vinardell *et al.*, 2015), que se identificaron debido a su identidad con la región *rkp-2* de *S. meliloti* (Kereszt *et al.*, 1998). Los genes *lpsL* (SFHH103_00769, 1026-pb) y *rkpK* (SFHH103_00768, 1314-pb), codifican una UDP-glucuronato 4-epimerasa (341 aminoácidos) y una UDP-glucosa 6-dehidrogenasa (437 aminoácidos). Estas enzimas presentan un 90% y 88% de identidad con las proteínas LpsL y RkpK de *S. meliloti* 1021, respectivamente. Por lo tanto, basándonos en sus homologías, *lpsL* y *rkpK* son los presuntos responsables de la síntesis de los ácidos galacturónicos y glucurónicos en *S. fredii* HH103. De hecho, mediante el programa Blastp no se han encontrado otras proteínas en el genoma de *S. fredii* HH103 que mostrasen una identidad de al menos el 40% con las secuencias aminoacídicas de RkpK y LpsL.

La región intergénica localizada entre los genes *lpsL* y *rkpK* de HH103 comprende 133 nucleótidos. Para comprobar si estos genes se co-transcriben, se usó la técnica de RT-PCR y los cebadores LK-F y LK-R para buscar un posible ARNm que cubriese tanto la región 3' de *lpsL* como el extremo 5' de *rkpK* (**Figura 16, Tabla 4**). Como controles positivos, se usaron las parejas de cebadores *qlpsL-F/qlpsL-R* y *qrkpK-F/qrkpK-R*, que permiten la amplificación de fragmentos internos de los genes *lpsL* y *rkpK* respectivamente. Como control negativo se usó la pareja de cebadores *lpsBE-F/lpsBE-R* que no da lugar a amplificación cuando se usa el ADNc como molde, debido a que los genes *lpsB* y *lpsE* se transcriben en direcciones opuestas (Margaret *et al.*, 2013). Cuando se usó el ADNg de HH103 como molde, todas estas parejas de cebadores dieron lugar a la amplificación de los fragmentos de ADN del tamaño esperado. Sin embargo, cuando se empleó ADNc de la estirpe silvestre (cultivada en medio YM) como molde de la PCR, solamente se obtuvo amplificación de los fragmentos internos de *lpsL* y *rkpK*, lo que indicaba que *lpsL* y *rkpK* no se co-transcriben. Estos resultados nos llevaron a investigar si cada uno de estos genes podría tener su propio promotor. Usando el programa BPRM (Solovyev y Salamov 2011;

<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>), encontramos secuencias de promotores bacterianos dependiente de sigma 70 aguas arriba de ambos genes, en las posiciones -25 y -150 para *lpsL* y *rkpK*, respectivamente. Además, el sistema GenDB (Meyer *et al.*, 2003), el cual se ha usado para la predicción automática y anotación del genoma de *S. fredii* HH103 (Weidner *et al.*, 2012; Vinardell *et al.*, 2015), predice la presencia de secuencias de unión a ribosoma (*Shine-Dalgarno*) para *lpsL* (GGGA, 8 pb antes del codón de inicio) y *rkpK* (AGGA, 7 pb antes del codón de inicio).

Los resultados mostrados en la **figura 16**, también sugieren que, al menos en las condiciones analizadas, los genes *lpsL* y *rkpK* tienen diferentes niveles de transcripción ya que, usando el ADNc como molde, la amplificación de los fragmentos internos de *lpsL* y *rkpK*, fue evidente después de 40 y 35 ciclos respectivamente. Para demostrar si esta diferencia era real, analizamos en profundidad la expresión de estos genes por dos métodos diferentes.

i) Se estudió la expresión de *lpsL* y *rkpK* usando *qPCR*. Para ello, se usó como molde el ADNc de HH103 cultivado en medio YM hasta una D.O.₆₀₀=1-1,2 y se midieron los niveles de ARNm de los fragmentos internos de *lpsL* y *rkpK* usando las parejas de cebadores de *qlpsL*-F/*qlpsL*-R y *qrkpK*-F/*qrkpK*-R, respectivamente. Siguiendo esta metodología, se obtuvo que los niveles de transcripción de *rkpK* fueron mucho mayores que los de *lpsL* (77,3±15,6 veces).

ii) Recientemente hemos llevado a cabo un análisis transcriptómico de *S. fredii* HH103 en ausencia o presencia de flavonoides (Pérez-Montaña *et al.*, 2016; disponible en la plataforma *Sequence Read Archive* del NCBI, en la base de datos de *BioProject* como *BioProject* ID PRJNA313151). Estos análisis muestran que el número de transcritos de *rkpK* es aproximadamente 20-25 veces superior al de *lpsL*, tanto en ausencia (5668 vs 222) como en presencia de genisteína (4280 vs 241) cuando las bacterias se cultivan en medio YM hasta una D.O.₆₀₀ de 1,2. Estos análisis también muestran que la transcripción de estos genes no se ve afectada significativamente por la presencia de genisteína.

Por lo tanto, nuestros resultados indican que no sólo *lpsL* y *rkpK* se transcriben de forma independiente, como se ha descrito previamente en la región *rkp-2* de *S. meliloti* Rm41,

sino que también los niveles de expresión de *rkpK* son mucho mayores que los de *lpsL*, al menos en las condiciones estudiadas (crecimiento en vida libre en medio YM hasta $DO_{600} = 1-1,2$).

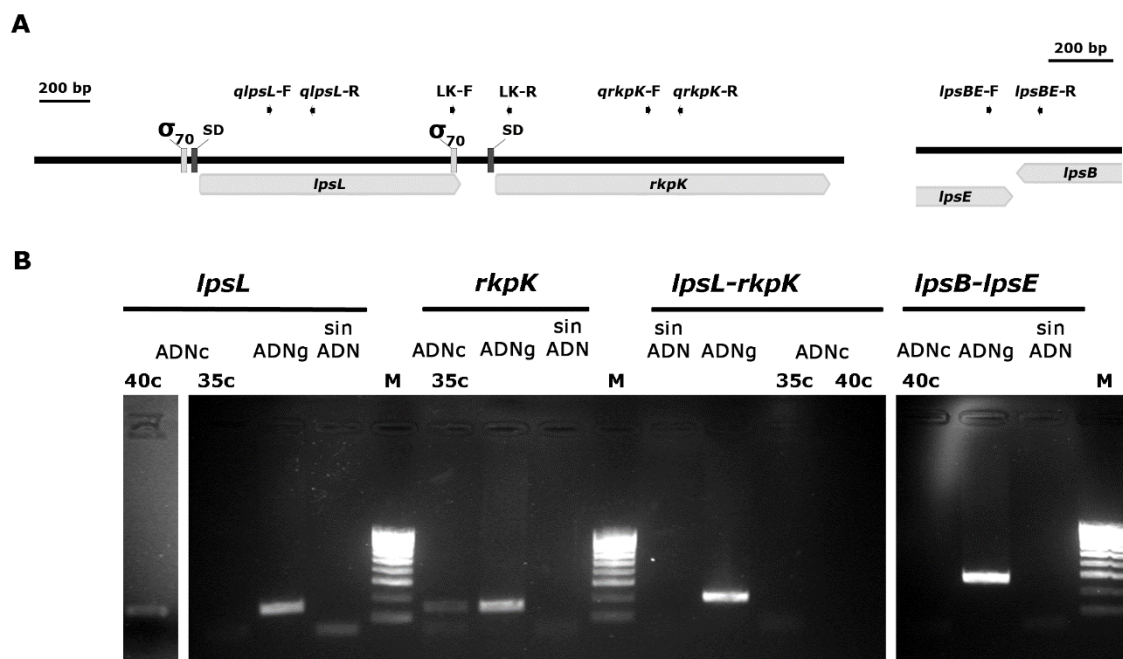


Figura 16. Los genes *lpsL* y *rkpK* no se con-transcriben en *S. fredii* HH103. (A) Organización genética de la región *rkp-2* de HH103. Están indicadas las posibles secuencias promotoras y de unión a ribosoma (anotada como σ₇₀ y SD, respectivamente), así como los sitios de unión de los cebadores usados en los experimentos de PCR. La región genética *lpsB-lpsE*, usado como control negativo de la co-transcripción (ver panel B), se muestra en la derecha. (B) Electroforesis en gel de agarosa de las muestras obtenidas de los experimentos de PCR y RT-PCR. Se muestra el molde (ADNg, ADNc de HH103 o sin ADN) y el número de ciclos que se usa para los experimentos de RT-PCR. Para los controles negativos (sin ADN), se usaron 40 ciclos. Para estos experimentos se usaron cebadores que amplificaban fragmentos internos de los genes *lpsL* y *rkpK*, o fragmentos que conectaban extremo 3' del final de *lpsL* y 5' del inicio de *rkpK* (*lpsL-rkpK*) o, en el caso del control de no cotranscripción, el extremo 3' de *lpsB* y *lpsE* (*lpsB-lpsE*). M, marcador ADN de 100pb. (Acosta-Jurado *et al.*, 2017).

Para el estudio de los dos genes que componen la región *rkp-2* de *S. fredii* HH103 se construyeron mutantes en cada uno de ellos (SVQ763, para el gen *lpsL*, y SVQ703, para el gen *rkpK*) por inserción del casete *lacZΔp-Gm^R* (Becker *et al.*, 2001). En ambos casos, la orientación transcripcional del casete fue opuesta al sentido de la transcripción del gen mutado. Siguiendo un escrutinio basado en PCR de la librería genómica de HH103, se aisló un cósmido (pMUS1193) que contenía la región *rkp-2* completa. Este cósmido se introdujo por conjugación en el mutante *rkpK*. Por razones desconocidas, no se ha podido introducir este cósmido en el mutante *lpsL*. Además, se obtuvieron versiones

complementadas de ambos mutantes (llamadas SVQ763C o *lpsL* C y SVQ703C o *rkpK* C) por integración de una copia del gen silvestre.

2.2. Los mutantes *lpsL* o *rkpK* de *S. fredii* HH103 están afectados en la producción del LPS, pero no del KPS.

En *S. meliloti* Rm41, la inactivación de cualquiera de los genes que constituyen la región *rpk-2* provoca una alteración del LPS detectable mediante análisis electroforéticos (Kereszt *et al.*, 1998). Los perfiles de los mutantes de la región *rpk-2* de HH103 se analizaron mediante PAGE en presencia de SDS (**Figura 17**, panel A), así como mediante experimentos de detección inmunológica usando el anticuerpo monoclonal NB6-228.22 (**Figura 17**, panel B), el cual reconoce el LPS de HH103 (Buendía-Clavería *et al.*, 2003). El perfil electroforético del LPS de los mutantes SVQ763 (*lpsL*) y SVQ703 (*rkpK*) (**Figura 17**, panel A, carriles 2 y 5 respectivamente) estaba alterado en comparación con el de la estirpe parental (líneas 1, 4, 7 y 8). Ambos mutantes mostraron alteraciones similares, las cuales consistieron en un incremento de la movilidad electroforética tanto del LPS liso (bandas de migración lenta, correspondientes al LPS completo mostrando diferentes grados de polimerización del antígeno-O) como del rugoso (bandas de migración rápida, correspondientes a las moléculas del LPS constituidas por el lípido A y el *core*). El anticuerpo monoclonal NB6-228.22 reconoció el LPS de *S. fredii* HH103 Rif^R (**Figura 17** panel B, carriles 1, 4, 7 y 8) pero no fue capaz de reconocer el LPS alterado de los mutantes *lpsL* y *rkpK* (**Figura 17**, carriles 2 y 5). Las versiones complementadas *in cis* de ambos mutantes así como el mutante *rkpK* portando el cósmido pMUS1193 mostraron un perfil electroforético y una detección inmunológica con NB6-228.22 indistinguibles de los de la estirpe silvestre (carriles 3, 6 y 9, de la **figura 17**).

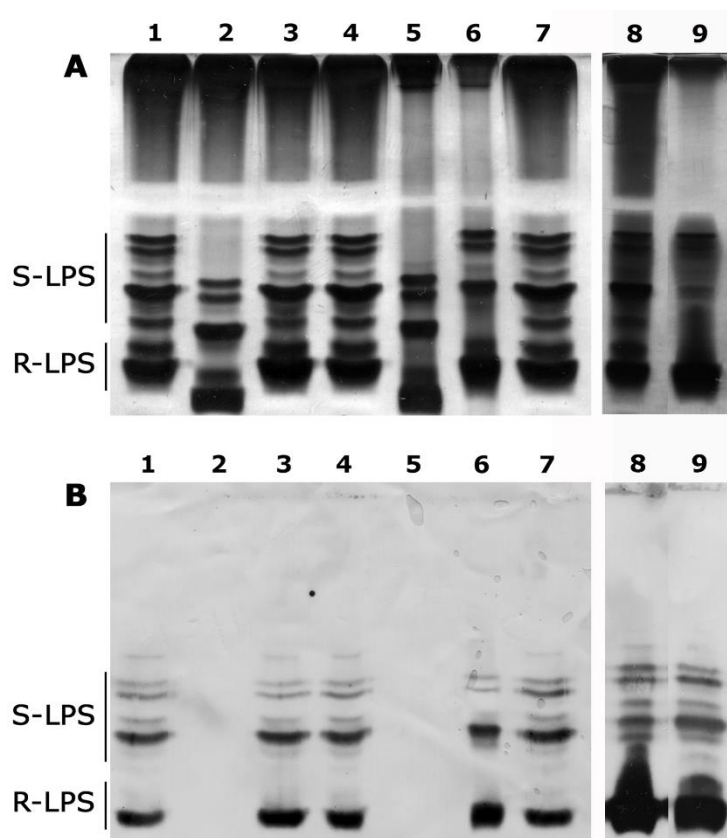


Figura 17. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) e inmunodetección de LPS de extractos crudos de *S. fredii* HH103 y los mutantes en la región *rkp-2*. Las muestras de LPS se sometieron a PAGE en presencia de SDS y se tiñeron con plata (panel A) o se sometieron a inmunodetección con el anticuerpo monoclonal NB6-228.22 (panel B). En la izquierda se indican las bandas correspondientes a LPS liso y al rugoso (S-LPS y R-LPS). Panel A y B: carriles 1, 4, 7 y 8, HH103; carril 2, mutante *lpsL*; carril 3, derivado *lpsL* complementado; carril 5, mutante *rkpK*; carril 6 derivado *rkpK* (pMUS1193); carril 9, derivado *rkpK* C. (Acosta-Jurado *et al.*, 2017).

Además de la producción del LPS, también se investigó la producción de KPS de los mutantes *lpsL* y *rkpK* mediante PAGE seguido de un tratamiento con Azul Alcian y tinción con plata (**Figura 18**, panel A). Los experimentos de PAGE para visualizar el KPS se llevaron a cabo en ausencia de SDS para evitar interferencias con el LPS. Para los mutantes SVQ763 (*lpsL*) y SVQ703 (*rkpK*), el material teñido con plata presumiblemente corresponde con la fracción de alto peso molecular del KPS (HMW) que fue indistinguible del silvestre, sugiriendo que la inactivación de los genes de la región *rkp-2* no afecta a la producción del KPS en HH103. Estos resultados se confirmaron por análisis de H-RMN (**Figura 18**). Como se esperaba, la producción de GC internos tampoco se vio afectado en ninguno de los mutantes de la región *rpk-2* (**Figura 18**, panel B).

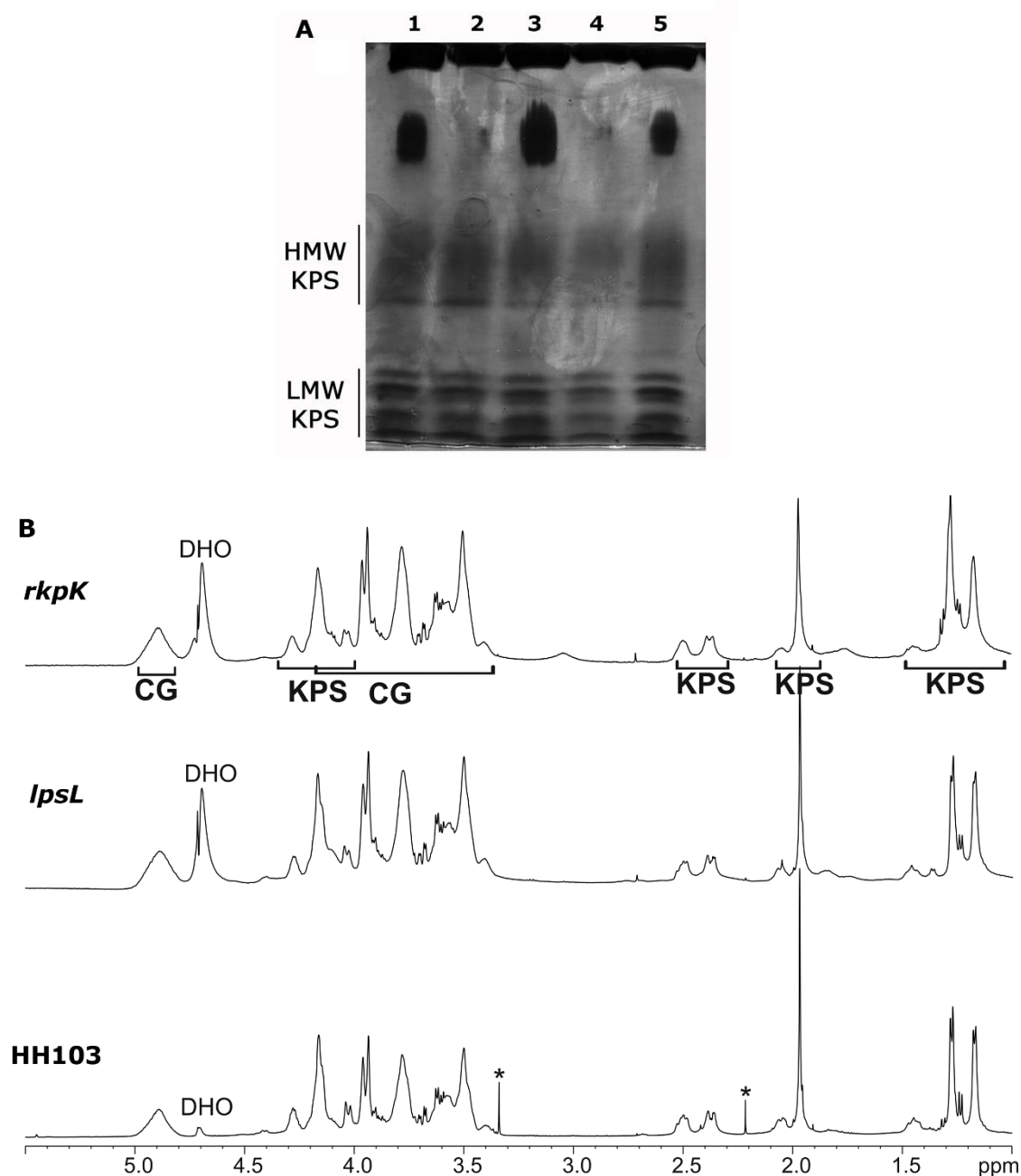


Figura 18. Los mutantes de la región *rkp-2* no están afectados en la producción del polisacárido capsular (KPS). (A) Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) de extractos crudos de KPS de *S. fredii* HH103 y los mutantes en la región *rkp-2*. La electroforesis se llevó a cabo en ausencia de SDS, se trató con azul Alcian y se tiñó con plata. En la izquierda se indican las formas de alto peso molecular y bajo peso molecular (HMW y LMW) del KPS. Carril 1, HH103; carril 2, mutante *lpsL*; carril 3, derivado *lpsL* complementado; carril 4, mutante *rkpK*; carril 5, derivado *rkpK* (pMUS1193). (B) Espectro de H-RMN (500 MHz) de extractos crudos celulares que contienen polisacáridos superficiales de *S. fredii* HH103 (marcado como HH103), mutante *lpsL* y mutante *rkpK*. Se indican las señales correspondientes al KPS, a los glucanos cíclicos (GC) y al solvente (HDO, agua deuterada). (Acosta-Jurado *et al.*, 2017).

2.3. El gen *rkpK* de *S. fredii* HH103 está involucrado en la producción de EPS.

La estructura del EPS de *S. fredii* HH103 se ha publicado recientemente (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014). El hecho de que este polisacárido contenga ácido glucurónico nos llevó a investigar la posible relación entre el gen *rkpK* y la síntesis de EPS.

Como se muestra en la **figura 20**, la inactivación del gen *rkpK* (mutante SVQ703) dio lugar a un aspecto rugoso cuando la bacteria se crece en placas de YMA. La complementación de la mutación, tanto en *cis* como en *trans*, reestableció la mucosidad hasta los niveles del silvestre. Por otro lado, la inactivación del gen *lpsL* no tuvo efecto alguno sobre la mucosidad bacteriana. Estos resultados sugerían una implicación de *rkpK* en la producción de EPS en HH103.

La producción de EPS se quiso investigar más en profundidad mediante la cuantificación de los azúcares libres extracelulares. La cantidad de equivalentes de glucosa en el sobrenadante del medio de cultivo del mutante *rkpK* ($2,7 \pm 1,1$ mg mL⁻¹) fue significativamente menor ($\alpha=5\%$, test no paramétrico de Mann-Whitney) en comparación con la de HH103 ($39,1 \pm 1,6$) y la de la versión complementada tanto por la presencia del cósmido pMUS1193 ($29,9 \pm 1,2$) como por la introducción de una copia silvestre del gen *rkpK* ($27,5 \pm 3,2$). En el caso del mutante *lpsL*, la cantidad de equivalentes de glucosa encontrada fue similar a la del cultivo de HH103 ($42,5 \pm 4,9$). Este estudio se completó mediante análisis de H-RMN de los exopolisacáridos aislados del medio de cultivo mediante precipitación con etanol. La **figura 19** muestra el espectro por H-RMN de los polisacáridos producidos por *S. fredii* HH103 y los mutantes *lpsL* (SVQ763) y *rkpK* (SVQ703), así como por las versiones complementadas del mutante *rkpK* (SVQ703C y SVQ703 pMUS1193). Tanto el espectro del mutante *lpsL*, como los de los complementados del mutante *rkpK* muestran señales de un EPS similar al de HH103 (salvo pequeñas diferencias en las de-O-acetilaciones de SVQ703C debido al proceso de calentamiento de las muestras para su adquisición) (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014). Estas señales, pertenecientes al EPS, no se encontraron en el caso del mutante *rkpK*, cuyo espectro sólo mostró señales provenientes del KPS (Gil-Serrano *et al.*, 1999) y de las mananas provenientes del extracto de levadura. Todos estos resultados indican que este mutante es incapaz de producir EPS.

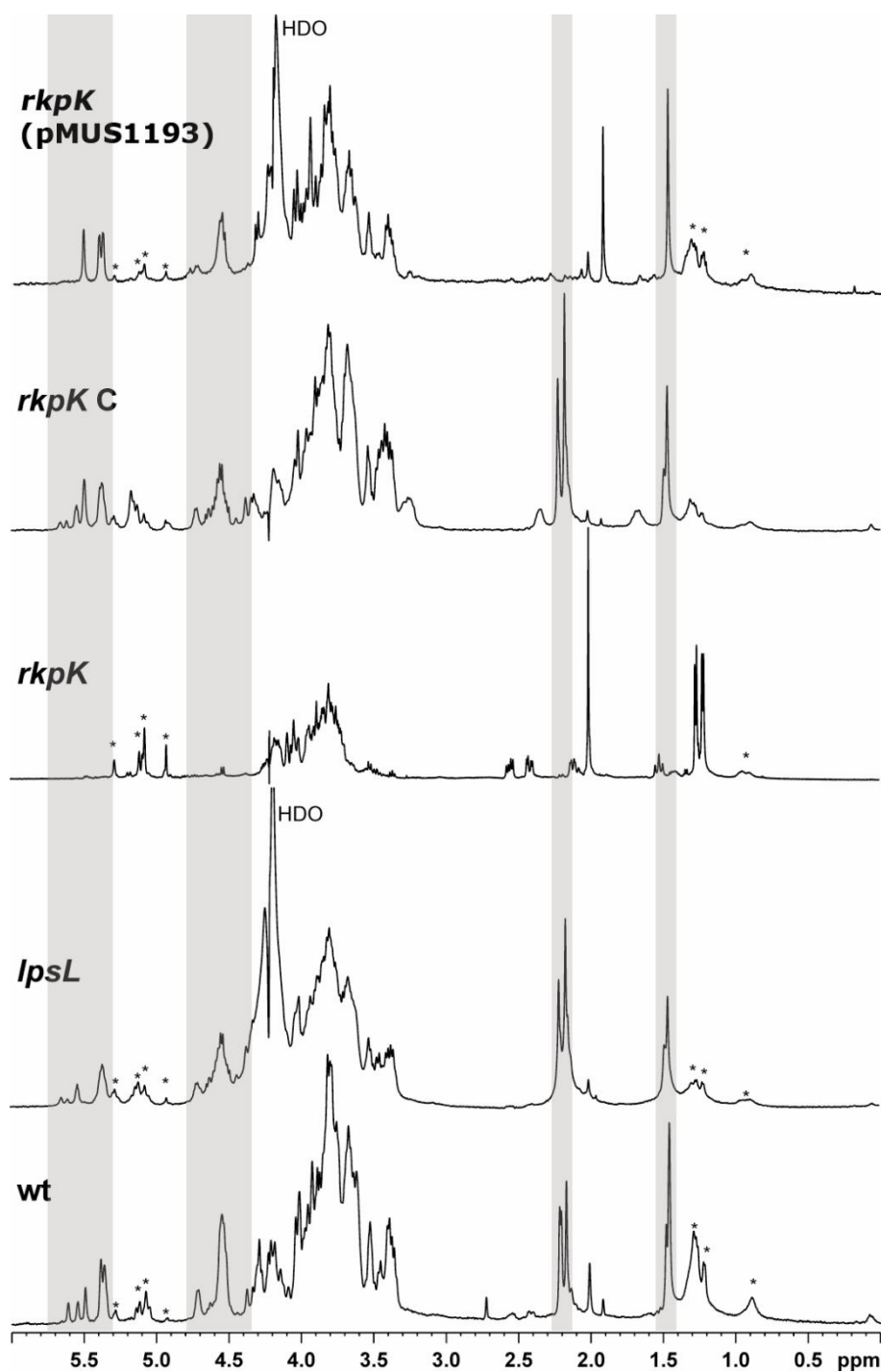


Figura 19. Espectro de H-RMN (500 MHz, 353 K) de los polisacáridos aislados del medio de cultivo de *S. fredii* HH103 (marcado como wt), los mutante *lpsL* (SVQ763) y *rkpK* (SVQ703), y las versiones complementadas del mutante *rkpK*, SVQ763C (marcado como *rkpK* C) y SVQ703 pMUS1193 (marcado como *rkpK* pMUS1193). HDO, indica agua monodeuterada. Los asteriscos indican señales del medio de cultivo (mananas). (Acosta-Jurado *et al.*, 2017).

Algunos rizobios, como *S. meliloti* 1021, producen un EPS capaz de unir calcofluor (CF), por lo que son capaces de mostrar una fluorescencia verde-azulada cuando crecen en un medio suplementado con CF y son irradiados con luz UV (fenotipo CF⁺) (Leigh *et al.*,

1985). La capacidad de los mutantes en *lpsL* y *rkpK* de *S. fredii* HH103 de unir CF se estudió mediante su crecimiento en placas de TY suplementadas con este colorante (**Figura 20**). En estos experimentos, también se incluyeron otros dos mutantes de *S. fredii* HH103 afectados en la producción de polisacáridos superficiales: el mutante *exoA* (Parada *et al.*, 2006) y el mutante *lpsB*, el cual produce un LPS alterado (Margaret *et al.*, 2013). Al contrario de lo que ocurre en la estirpe silvestre y en los derivados *exoA* y *lpsB*, los dos mutantes de la región *rkp-2* exhibieron un fenotipo CF⁺, mientras que las estirpes complementadas de ambos mutantes mostraron un comportamiento similar al de la estirpe parental. A su vez, la capacidad de unión de CF del mutante *lpsL* fue superior a la del mutante *rkpK*.

El rojo Congo es un colorante que se ha usado con frecuencia cuando se investigan estirpes mutantes en polisacáridos, debido a su capacidad para unir muchos tipos de polisacáridos bacterianos (Thomas-Oates *et al.*, 2003). Algunos mutantes afectados en polisacáridos superficiales tienen alterado su capacidad para unir rojo Congo, dando lugar a una coloración diferente cuando se comparan con la estirpe parental. Debido a ello, se examinó el fenotipo de los mutantes de la región *rkp-2* de *S. fredii* HH103, así como el de los derivados *exoA* y *lpsB*, cuando se cultivaron en placas de TY suplementado con este colorante. Sorprendentemente, y como se muestra en la **figura 20**, el crecimiento de los mutantes *lpsL* y *rkpK*, así como el del mutante *exoA*, se vio disminuido de forma acusada en presencia de rojo Congo. Los complementados de ambos mutantes si fueron capaces de crecer en estas condiciones y mostraron un aspecto similar al silvestre. Ninguna de las estirpes probadas mostró una acumulación significativa de este colorante.

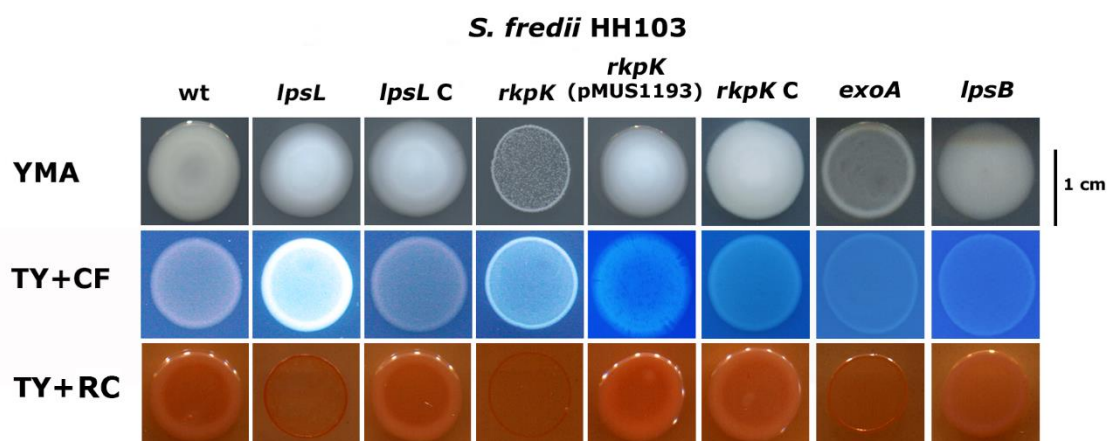


Figura 20. Mucosidad (en medio YMA) y capacidad de unión de calcofluor y rojo Congo (en medio TY) de *S. fredii* HH103 y diferentes mutantes afectados en la producción de polisacáridos superficiales. (Acosta-Jurado *et al.*, 2017).

En estudios anteriores, se estudió la osmotolerancia de *S. fredii* HH103 y la de su derivado *exoA* en medios de cultivo suplementados con NaCl o sacarosa. Los resultados obtenidos mostraron que el crecimiento del mutante *exoA* se vio afectado, de forma severa, en medio mínimo (MM) bajo condiciones de estrés hiperosmótico (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014). En este capítulo se ha analizado si los cambios en la superficie celular, promovidos por la inactivación de *lpsL* y *rkpK*, tienen algún efecto sobre la osmosensibilidad (**Figura 21**). Además, se han incluido en estos experimentos los mutantes *exoA* y *lpsB* como representantes de estirpes carentes de EPS (*exoA*) o con LPS alterado (*lpsB*). Los resultados obtenidos indicaron que el mutante *rkpK* mostró una viabilidad baja en MM y que su crecimiento se afectó parcialmente en presencia de un 5% (m/v) de sacarosa, y muy notablemente en presencia de NaCl 25 mM, siendo nulo en MM suplementado con NaCl 100 mM. El mutante *lpsL* mostró un comportamiento similar al del derivado *lpsB*: ambos mutantes se mostraron ligeramente más osmosensibles a la sacarosa que la estirpe silvestre. Tanto el mutante *lpsB* como el *lpsL*, especialmente éste último, mostraron una sensibilidad más elevada al estrés hiperosmótico con NaCl que *S. fredii* HH103. La complementación de las mutaciones en *rkpK* y *lpsL* reestableció el comportamiento silvestre frente a los diferentes estreses osmóticos en MM.

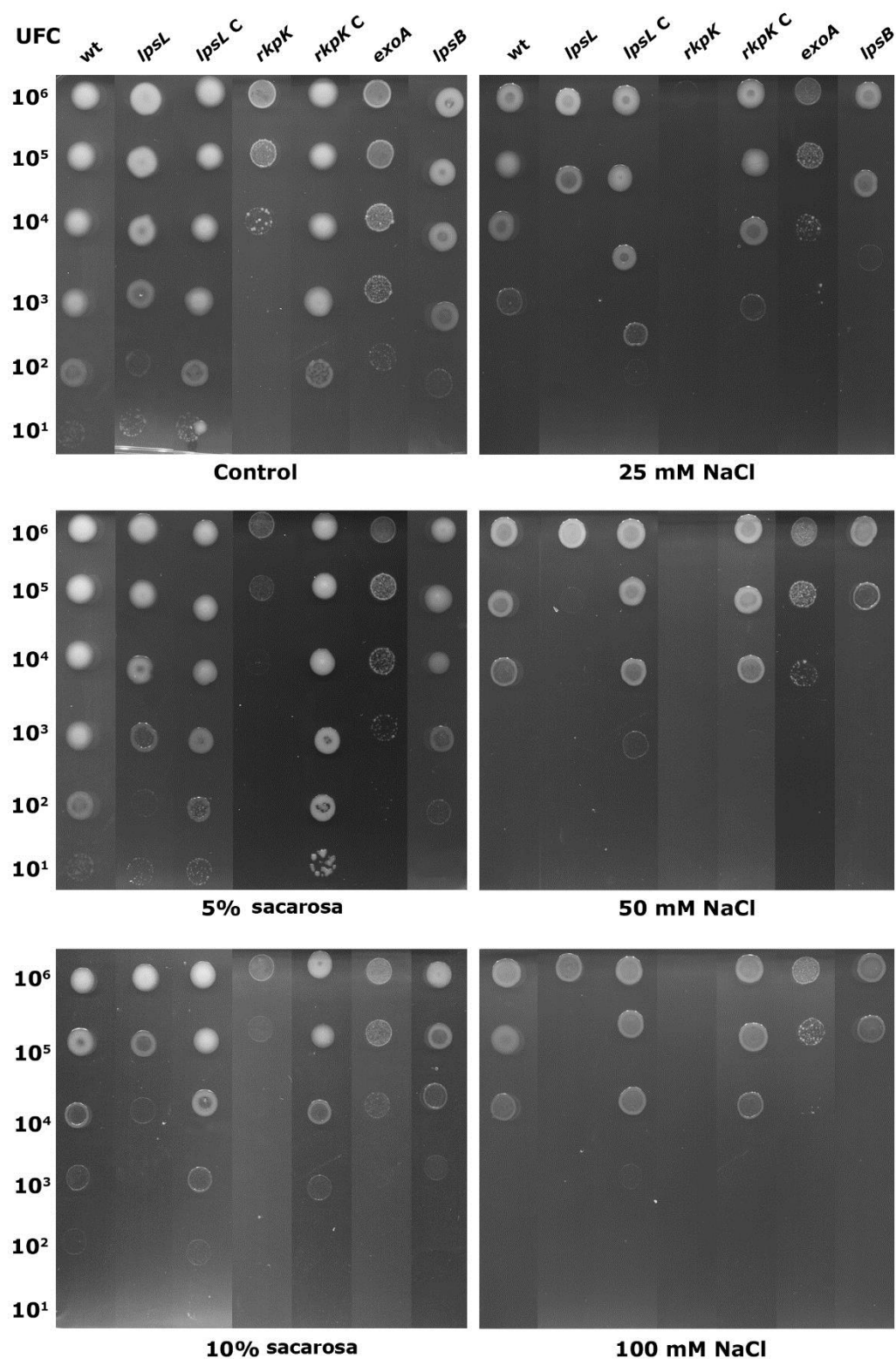


Figura 21. Osmotolerancia de *S. fredii* HH103 y los mutantes en la región *rkp-2*. Los cultivos bacterianos se crecieron en MM suplementado con diferentes concentraciones de NaCl o sacarosa. En cada columna, las gotas contienen aproximadamente el número de unidades formadoras de colonias (UFC) indicado en la izquierda. Se muestra un ejemplo representativo de al menos dos experimentos. Las imágenes se tomaron 5 días después de la inoculación. (Acosta-Jurado *et al.*, 2017).

2.4. El mutante *rkpK* posee alterada la capacidad de formación de *biofilm* y auto-agregación.

Los polisacáridos superficiales de los rizobios juegan un papel importante en la formación de *biofilm* y en la capacidad de auto-agregación de la bacteria (Downie, 2010; Sorroche *et al.*, 2012). Debido a ello, se estudió si la inactivación de *rkpK* y *lpsL* afectaba a estas características.

Como se muestra en la **figura 22** panel A, la inactivación de *rkpK*, pero no la de *lpsL*, da lugar a un incremento de la auto-agregación cuando se compara con la estirpe silvestre. En relación a la formación de *biofilm* sobre superficies plásticas, la estirpe mutante en *rkpK* mostró una reducción significativa en esta característica en comparación con HH103 o el mutante *lpsL* (**Figura 22**, panel B). La complementación, tanto en *cis* como en *trans*, de la mutación en *rkpK* reestableció los niveles tanto de la formación de *biofilm* como de la capacidad de auto-agregación (**Figura 22**).

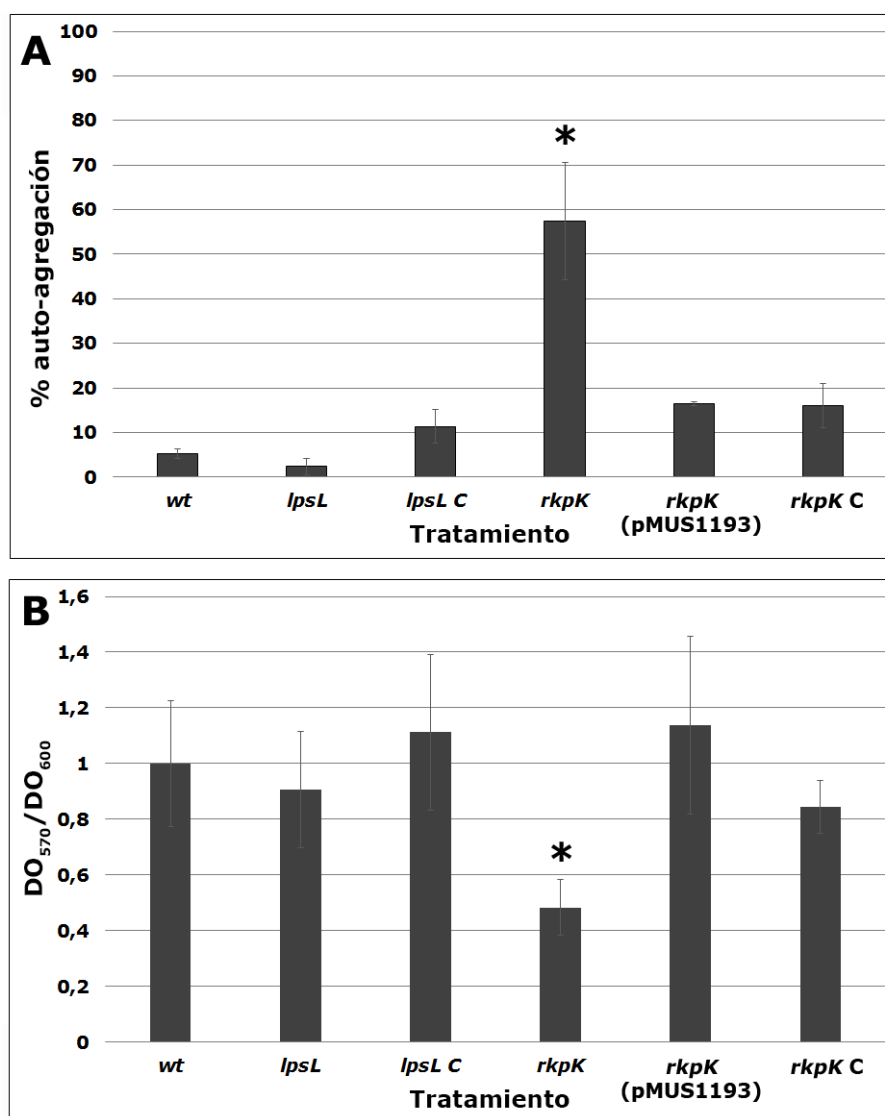


Figura 22. Capacidad de auto-agregación (panel A) y de formación de *biofilm* (panel B) de *S. fredii* HH103 y los mutantes de la región *rkp-2*. Los tratamientos que fueron significativamente diferentes de la estirpe silvestre (test no paramétrico de Mann-Whitney, $\alpha = 5\%$) están marcados con un asterisco. (Acosta-jurado *et al.*, 2017).

2.5. La inactivación de los genes de la región *rkp-2* disminuye la capacidad simbiótica de *S. fredii* HH103 con soja y *cowpea*

El fenotipo simbiótico de los mutantes en la región *rkp-2* se investigó con dos plantas hospedadoras, *Glycine max* cv. Williams (soja) y *Vigna unguiculata* cv. Bisbee Red (*cowpea*). Se analizaron tres parámetros: peso seco de la parte aérea, número de nódulos y el peso fresco de los nódulos (**Tabla 10**).

Tabla 10. Respuesta de *G. max* cv. Williams y *V. unguiculata* a la inoculación con *S. fredii* HH103 y sus derivados *lpsL* (SVQ763) y *rkpK* (SVQ703) ^a. (Acosta-jurado *et al.*, 2017).

Leguminosa testada	Inoculante ^c , (gen mutado)	Peso seco parte aérea (g) ^d	Número de nódulos	Peso fresco de nódulos (mg)
<i>G. max</i>	HH103 Rif ^R	1,62±0,37	79,0±17,8	832,4±144,6
	SVQ763 (<i>lpsL</i>)	0,55±0,12*	0±0*	0±0*
	SVQ763C	1,42±0,47	82,5±23,2	814,3±201,1
	SVQ703 (<i>rkpK</i>)	1,87±0,68	56,6±16,1	874,4±346,3
	SVQ703 pMUS1193	1,38±0,44	72,2±25,1	748,0±226,8
<i>V. unguiculata</i>	HH103 Rif ^R	0,99±0,36	43,9±12,9	604,2±163,8
	SVQ763 (<i>lpsL</i>)	0,14±0,04*	0±0*	0±0*
	SVQ763C	0,96±0,39	44,2±7,5	605,6±215,3
	SVQ703 (<i>rkpK</i>)	0,42±0,12*	25,4±7,3*	201,7±82,2*
	SVQ703C ^e	1,37±0,36	56,8±11,9	756±225
	SVQ703 pMUS1193	1,32±0,68	56,3±25,7	721,3±352,3

^a Los datos representan la media de 4-5 jarros conteniendo 2 plantas para soja y 8-10 plantas para *cowpea*. Los nódulos y la parte aérea se recogieron a los 39 dpi para soja y 35 dpi para *cowpea*.

^b Para cada leguminosa, cada mutante se comparó con la estirpe parental HH103 usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. * Los números de la misma columna son significativamente diferentes de los mismos de HH103 al nivel de $\alpha = 5\%$.

^c El peso seco de la parte aérea de las plantas no inóculadas fue de 0,42±0,08 g para soja (por jarro) y 0,13±0,05 g para *cowpea* (por planta).

^d Las bacterias aisladas de 12 nódulos para cada inoculante mostraron las resistencias esperadas.

^e Los datos mostrados para esta estirpe se obtuvieron en un ensayo de nodulación independiente en el cual, SVQ703C no fue diferente de HH103 y sí significativamente diferente de SVQ703 en los tres parámetros analizados.

El comportamiento simbiótico del mutante *rkpK* difirió dependiendo de la planta hospedadora con la que se lleve a cabo el proceso simbiótico. La interacción con soja no se vio afectada, mientras que la capacidad de nodulación con *cowpea* se vio disminuida, aunque fue capaz de inducir nódulos fijadores de nitrógeno en esta planta (**Tabla 10**, **Figura 23**). La presencia del cósmido pMUS1193 o la introducción en *cis* de una copia silvestre de *rkpK* (SVQ703C) mejoró la capacidad simbiótica del mutante *rkpK* hasta los niveles de la estirpe parental. Otra característica relevante de este mutante, es que las plantas de *cowpea* inoculadas con esta estirpe mostraron un patrón de nodulación más disperso que las plantas inoculadas con la estirpe parental (**Figura 23**).



Figura 23. Patrón de nodulación de *S. fredii* HH103 (A) y su derivado *rkpK*, SVQ703 (B) en *cowpea*. (Acosta-jurado et al., 2017).

Por otro lado, se investigó la capacidad competitiva de la estirpe mutante en *rkpK* en soja. Dicho mutante se vio negativamente afectado cuando se co-inoculó con su estirpe parental HH103 en un ratio 1:1. En dos ensayos diferentes, sólo el 23,3 y 0,9% de los nódulos formados estaban ocupados por el mutante *rkpK*, respectivamente. La presencia del cósmido pMUS1193 en la estirpe SVQ703 reestableció la capacidad competitiva de nodular soja (48,5% de los nódulos).

El mutante en *lpsL* mostró una deficiencia completa en su capacidad simbiótica ya que no se encontraron nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de las dos plantas analizadas (**Figura 24**). Debido a ello, las plantas de soja y *cowpea* inoculadas con la estirpe mutante en el gen *lpsL* mostraron síntomas claros de deficiencia de nitrógeno y sus pesos se asemejaron a los de las plantas no inoculadas (**Tabla 10, Figura 24**). En el caso de soja, pero no en *cowpea*, las plantas inoculadas con el mutante *lpsL* presentaron gran cantidad de pseudonódulos (**Figura 24**, paneles D y F). Los ensayos de reducción de acetileno (ARA) confirmaron que estas estructuras no fijaban nitrógeno ya que no se detectó ningún pico de etileno. La complementación de este mutante por introducción de una copia silvestre en *cis*, reestableció los parámetros simbióticos analizados en ambas plantas hospedadoras hasta los niveles alcanzados por la estirpe silvestre, incluyendo la fijación estimada por ARA para las plantas de soja ($26,0 \pm 5,5$ vs $23,3 \pm 5,8$ nmoles de etileno por planta y hora en el silvestre).

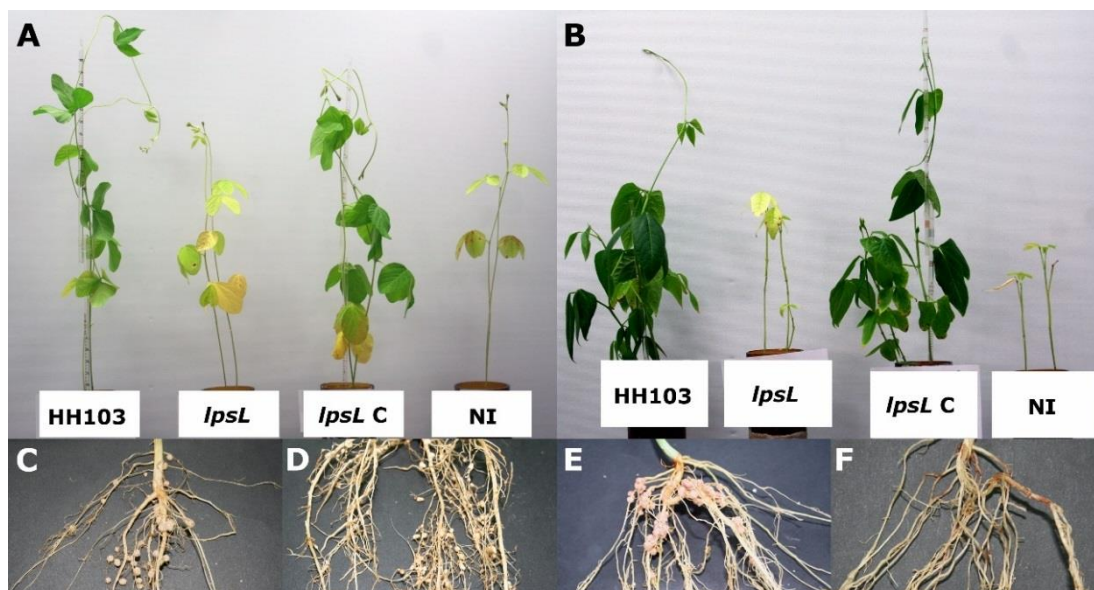


Figura 24. Fenotipo simbiótico de *S. fredii* HH103 (marcado como HH103), su derivado *lpsL*, y la estirpe complementada del mutante *lpsL* SVQ763C (marcado como *lpsL* C) con soja (paneles A, C, D) y *cowpea* (paneles B, E, F). Las plantas no inoculadas están marcadas como NI. **A, B:** Parte aérea de soja (A) y *cowpea* (B). **C, E:** raíces de soja (C) y *cowpea* (E) inoculadas con HH103. **D, F:** Raíces de soja (D) y *cowpea* (F) inoculadas con SVQ763. (Acosta-jurado *et al.*, 2017).

Para una mejor comprensión de la deficiencia simbiótica de SVQ763 con las dos plantas investigadas, se llevaron a cabo estudios adicionales. Primero, se analizó la formación de primordios nodulares en raíces de soja y *cowpea*. Como se muestra en la **figura 25**, la presencia del mutante *lpsL* promovió el inicio del desarrollo del nódulo no sólo en soja (donde se encontraron pseudonódulos) sino también en *cowpea* (donde no se encontraron estructuras macroscópicas después de la inoculación con SVQ763).

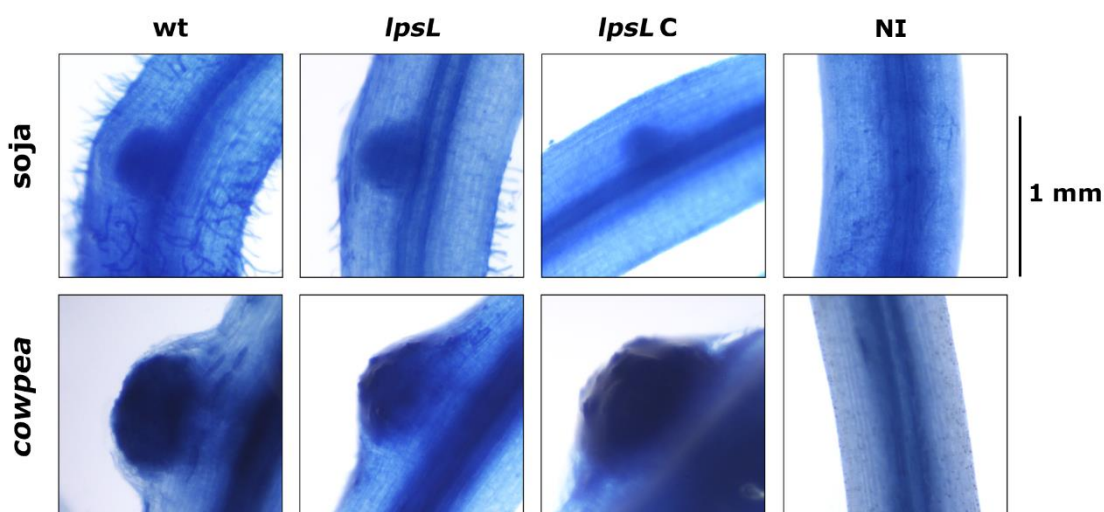


Figura 25. Primordios nodulares en raíces de soja o *cowpea* inoculadas con *S. fredii* HH103 y varios derivados. (Acosta-jurado *et al.*, 2017).

Además, se introdujo el plásmido pFAJDsRed (Acosta-Jurado *et al.*, 2016c), que expresa constitutivamente la proteína roja fluorescente DsRed, en *S. fredii* HH103 y en el mutante *lpsL* con objeto de investigar tanto la curvatura del pelo radical como la infección en raíces de soja y *cowpea*. Mediante microscopía de epifluorescencia, se comprobó que HH103 fue capaz de inducir la curvatura de los pelos radicales en *cowpea* y soja (**Figura 26**); la curvatura del pelo radical también se indujo por el mutante *lpsL* en el caso de *cowpea* (**Figura 26**, panel B) pero no en el caso de soja (**Figura 26**, panel D).

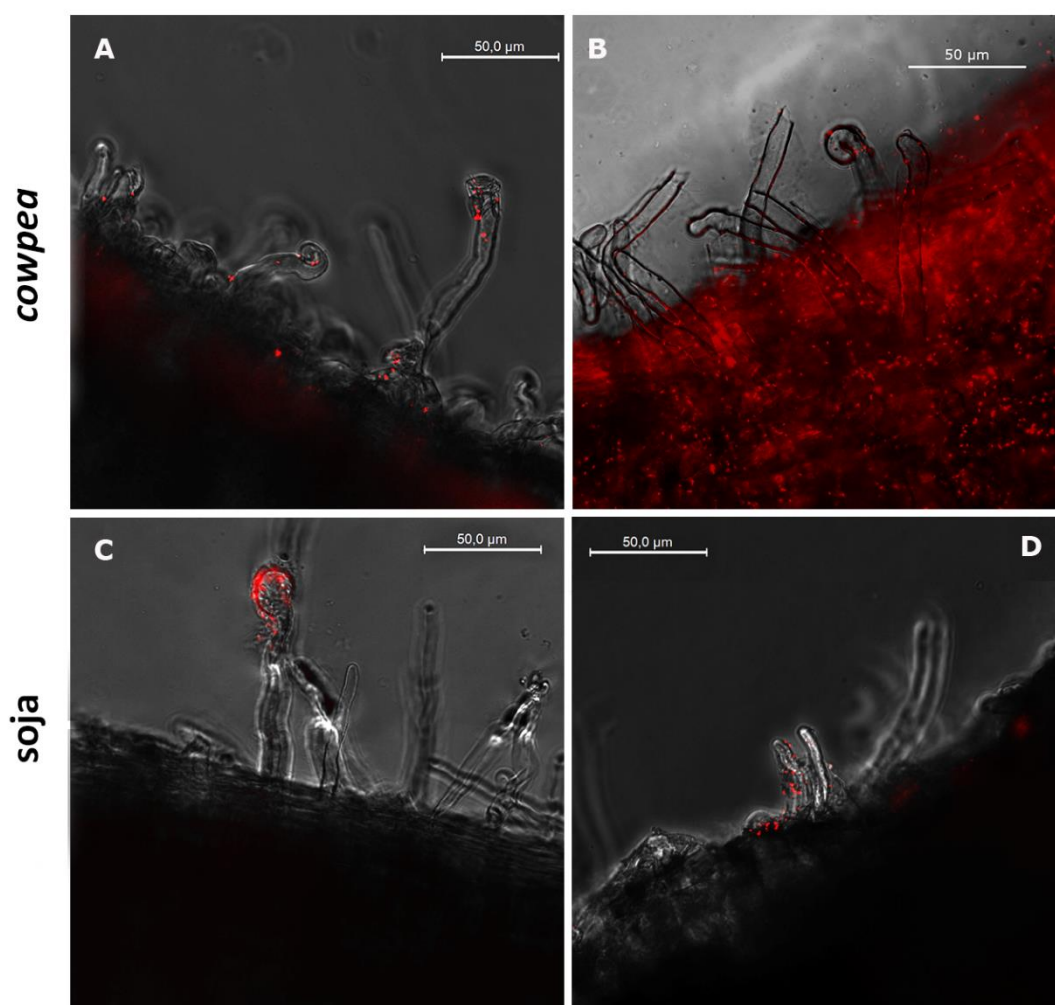


Figura 26. Análisis de microscopía de epifluorescencia de raíces de *cowpea* y soja inoculadas con *S. fredii* HH103 (paneles A y C) y su derivado *lpsL* (paneles B y D). Las barras corresponden a 50 μm . (Acosta-jurado *et al.*, 2017).

La infección bacteriana se estudió mediante microscopía confocal (**Figura 27**). En el caso de *cowpea*, no se encontraron tubos de infección bien definidos ni con la estirpe silvestre (paneles A y B) ni con el derivado *lpsL* (paneles C y D). Sin embargo, se pudo

detectar una curiosa diferencia entre ambas estirpes. Las células de *S. fredii* HH103 se distribuyeron de forma dispersa entre las células de la planta y no formaron agregados. Por el contrario, la mayoría de las células del mutante *lpsL* tendieron a agregarse en estructuras esféricas que se localizaban dentro de la raíz, pero en los espacios intercelulares, lo que podría sugerir una respuesta defensiva por parte de la planta. En cuanto a soja, se visualizaron tubos de infección en el caso de HH103 (paneles E y F), pero no en el del mutante *lpsL*, cuyas células se localizaban sólo en el exterior de las raíces (paneles G y H).

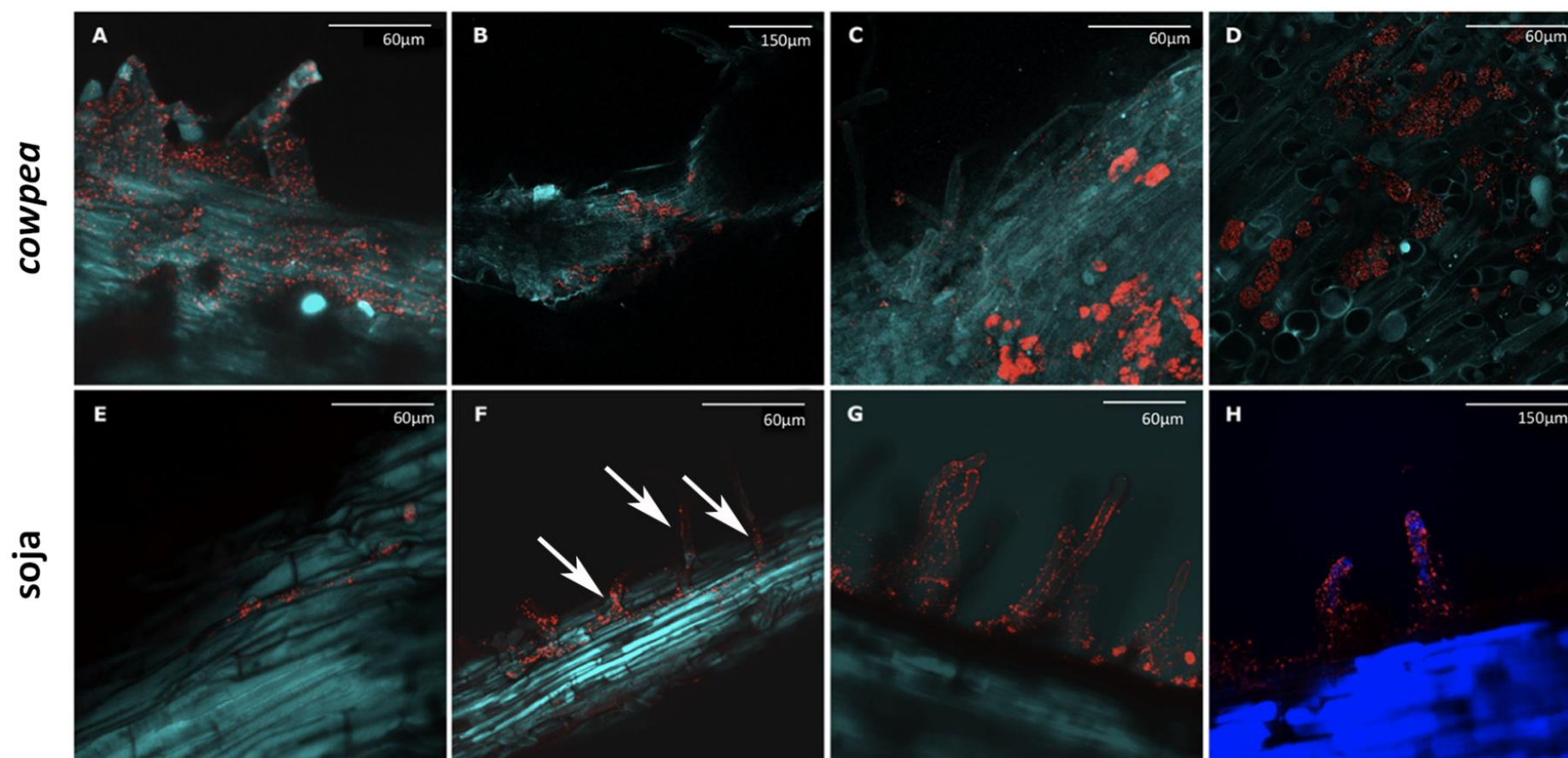


Figura 27. Análisis de microscopía confocal de raíces de soja y *cowpea* inoculadas con *S. fredii* HH103 (paneles A, B, E, y F) y su derivado *lpsL* (paneles C, D, G y H). Las barras corresponden a 20 μm para los paneles A, C hasta G, y 50 μm para los paneles B y H. Las flechas blancas del panel F señalan tubos de infección de HH103 en raíces de soja. (Acosta-jurado *et al.*, 2017).

3. Discusión

La región *rkp-2* se describió por primera vez en *S. meliloti* Rm41 (Kereszt *et al.*, 1998). Los genes *lpsL* y *rkpK* codifican una UDP-glucuronato 4-epimerasa y una UDP-glucosa 6-dehidrogenasa respectivamente. Así, RkpK es el responsable de la oxidación de UDP-glucosa a UDP-ácido glucurónico, mientras que LpsL se encarga de la conversión de UDP-ácido glucurónico a UDP-ácido galacturónico. El nombre de esta región genética es alusivo a la implicación del gen *rkpK* en la producción del KPS en Rm41, debido a que el polisacárido capsular de esta estirpe contiene ácido glucurónico (Reuhs *et al.*, 1998). El polisacárido capsular es específico de estirpe, y en *S. fredii* HH103, el KPS es un homopolisacárido en el cual la unidad de repetición es un derivado del ácido pseudoamínico (Gil-Serrano *et al.*, 1999). Por consiguiente, el hecho de que ni la inactivación de *lpsL* ni la de *rkpK* afecte a la producción del KPS en HH103 es coherente con la ausencia de ácidos glucurónicos y galacturónicos en este polisacárido. Por el contrario, estos ácidos urónicos están presentes en el LPS de HH103 (Miguel Ángel Rodríguez Carvajal, comunicación personal), lo cual explica el hecho de que ambos mutantes de la región *rkp-2* en HH103 estén afectados en la producción de LPS como se describió previamente para *S. meliloti* Rm41 (Kereszt *et al.*, 1998). El hecho de que la alteración en el perfil electroforético en ambos mutantes (*lpsL* y *rkpK*) afecte tanto al LPS liso como al rugoso, sugiere claramente que la parte estructural afectada podría ser el lípido A y/o el *core* oligosacárido. De hecho, la presencia de ácidos urónicos es común en el *core* del LPS de muchos rizobios. Además, en varios rizobios, incluyendo *Rhizobium etli* CE3, pero no *S. fredii* NGR234, la fracción del lípido A porta sustituciones de ácido galacturónico (revisado en De Castro *et al.*, 2008)

En *S. fredii*, el ácido glucurónico está presente en otro polisacárido superficial: el EPS (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014). Esta es la razón por la cual decidimos investigar el efecto de las mutaciones en la región *rkp-2* sobre la producción de EPS. La subunidad de repetición del EPS de HH103 está compuesto de glucosa, galactosa, ácido glucurónico y ácido pirúvico en un ratio 5:2:2:1, localizándose los dos residuos de ácido glucurónico en la cadena lateral. Curiosamente, La inactivación de *rkpK* no da lugar a la síntesis de una forma modificada del EPS en el que estaría afectada la composición de la cadena lateral, sino que provoca la abolición completa de la producción de EPS tal y como se

deduce del aspecto rugoso del mutante *rkpK* sobre placas de YM y de la ausencia en los espectros de H-RMN de señales correspondientes a subunidades de EPS, ya sea silvestre o subunidades modificadas carentes de cadena lateral, cuando se analizaron los sobrenadantes de los cultivos del mutante *rkpK* en medio YM. Este hecho sugiere que la síntesis apropiada de la subunidad de repetición es absolutamente necesario para su ensamblaje. Sin embargo, es necesario llevar a cabo investigaciones más en profundidad para averiguar si el proceso afectado por la inactivación de *rkpK* podría ser la síntesis de la unidad de repetición, su transporte al exterior celular o la polimerización de estas subunidades en el EPS maduro.

La inactivación de *lpsL* y la de *rkpK* provocan la alteración de varias características de la bacteria. Recientemente nuestro grupo ha demostrado que la ausencia de EPS reduce drásticamente la capacidad de *S. fredii* HH103 para adherirse y desarrollar biomasa sésil sobre superficies inertes (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014, Acosta-Jurado *et al.*, 2016b). En consonancia con esos resultados anteriores, el mutante *rkpK* mostró una capacidad reducida de formación de *biofilm*, a diferencia de lo que ocurre con el mutante *lpsL* (no afectado en la producción de EPS) que se mantiene en niveles del silvestre. En estudios anteriores se ha comprobado que el mutante *exoA* muestra un incremento en la osmosensibilidad en MM (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014); los estudios realizados en esta tesis muestran que el derivado *rkpK* no sólo se afecta negativamente por la presencia de sacarosa o NaCl, sino que su crecimiento también se afecta en MM en ausencia de estos compuestos, indicando que el doble defecto en la producción de polisacáridos superficiales (ausencia de EPS y alteración de LPS) provoca una alta osmosensibilidad. Por otro lado, las alteraciones en el LPS de los mutantes *lpsB* y *lpsL* tienen un impacto similar y moderado sobre la osmosensibilidad de HH103.

Los mutantes en la región *rkp-2*, al contrario de lo que ocurre en la estirpe silvestre, mostraron un fenotipo CF⁺ cuando se cultivan en placas de TY con calcoflúor y se exponen a condiciones de UV. Esta capacidad es más fuerte en el mutante *lpsL* que en el derivado *rkpK*. El fluorocromo calcoflúor se une a polisacáridos con uniones de tipo β , más específicamente a polímeros que contengan unidades β (1-3) o β (1-4)-D-glucopiranosil (Pérez-Mendoza *et al.*, 2015). Aunque normalmente la unión de calcoflúor se relaciona con el EPS, como es el caso del succinoglucano de *S. meliloti*

(Finan *et al.*, 1985; Leigh *et al.*, 1985), existen ejemplos de otros polisacáridos capaces de unir este colorante como es el caso de nuevo (1 → 3) (1 → 4)-β-D-glucano recientemente descrito en *S. meliloti* (Pérez-Mendoza *et al.*, 2015). El LPS de los rizobios, además del antígeno-O, contiene un *core* oligosacárido que puede estar compuesto por hasta 15 residuos (revisado en López-Baena *et al.*, 2016). Debido a que ambos mutantes de la región *rkp-2* están afectados en su LPS, el incremento de la capacidad de unir CF podría estar relacionado con las alteraciones en dicho polisacárido. Sin embargo, no sólo la capacidad de unión de CF del mutante *lpsL* fue mayor que el mutante *rkpK*, sino que otro de los mutantes de HH103 alterados en el LPS, *lpsB*, no difirió de la estirpe silvestre en este aspecto. Claramente, se necesitan más investigaciones en profundidad para aclarar si efectivamente determinadas alteraciones del LPS originan un aumento de la unión a CF en *S. fredii* HH103.

Los mutantes de la región *rkp-2* de *S. fredii* HH103 también muestran diferencias con la estirpe silvestre en cuanto a su comportamiento cuando se cultivan en TY suplementado con rojo Congo. Mientras que la estirpe parental crece normalmente, ambos mutantes se vieron severamente afectados en su crecimiento cuando se cultivaron en estas condiciones. Sorprendentemente, la inactivación de *exoA*, pero no la de *lpsB*, dio lugar al mismo fenotipo. Estos resultados sugieren que tanto la ausencia de EPS como determinadas alteraciones del LPS (como la del mutante *lpsL*) confiere sensibilidad a la presencia de este colorante.

La inactivación de *lpsL* y *rkpK* tiene diferentes efectos sobre en el desarrollo simbiótico de *S. fredii* HH103 con las dos leguminosas probadas: *G. max* (soja) y *V. unguiculata* (*cowpea*). El mutante en *rkpK* está claramente afectado con *cowpea* pero no muestra ningún defecto simbiótico con soja. Este es un resultado interesante ya que los mutantes en *rkpU* (afectado en KPS y LPS) y en *lpsB* (afectado en LPS) de *S. fredii* HH103 están más afectados en simbiosis con soja que con *cowpea* (Hidalgo *et al.*, 2010; Margaret *et al.*, 2013). Aunque la inactivación de *rkpK* afecta al LPS e impide la producción de EPS, probablemente el defecto simbiótico podría ser debido a la alteración del LPS ya que un mutante en *exoA* (EPS⁻) no se afecta significativamente en su interacción con *cowpea* (Hidalgo *et al.*, 2010).

El mutante *lpsL* mostró una deficiencia simbiótica drástica con soja y *cowpea*. Es necesario destacar que el mutante en *lpsL* induce la formación de numerosos pseudonódulos en soja, pero no en raíces de *cowpea*. Sin embargo, tanto las raíces de *cowpea* como las de soja desarrollaron primordios nodulares tras ser inoculadas con SVQ763. En nuestra opinión, este resultado era esperado, ya que, según nuestros conocimientos, la formación de los primordios es dependiente de factores Nod y no de la percepción de LPS (Jones *et al.*, 2007; Downie, 2010). Por otro lado, el mutante *lpsL*, fue capaz de inducir la curvatura de pelos radicales en *cowpea*, pero no en soja (a diferencia de la estirpe silvestre que lo hizo en ambas plantas). A nuestro entender estos resultados son sorprendentes ya que se ha descrito que esta respuesta sólo depende de factores Nod (Jones *et al.*, 2007), lo que indica claramente que se requieren investigaciones más en profundidad para dilucidar este punto. De hecho, se piensa que los polisacáridos superficiales de los rizobios son importantes especialmente durante la infección bacteriana de las raíces hospedadoras, de modo que actúan como señales simbióticas y/o previenen las respuestas defensivas de la planta (Downie, 2010; López-Baena *et al.*, 2016). Nuestros estudios de microscopía confocal sugieren que el derivado *lpsL* es incapaz de infectar adecuadamente tanto las raíces de soja como las de *cowpea*. En el caso de las raíces de soja, como se comentó anteriormente, este mutante mostró una incapacidad para entrar en las raíces y no se detectaron tubos de infección en progresión en el córtex radical, al contrario de lo que ocurre en la estirpe parental. En el caso de *cowpea*, las células de SVQ763 se podían encontrar dentro de las raíces, pero la mayoría de ellas formaban agregados situados entre las células radicales que no se encontraban en raíces inoculadas con *S. fredii* HH103, sugiriendo que este mutante podría estar sufriendo una respuesta defensiva de la planta. También hay que resaltar que las células de la estirpe silvestre se encontraban colonizando espacios intercelulares de la raíz (sin formar agregados), y que no se visualizaron tubos de infección. Claramente, hace falta realizar más estudios para dilucidar qué modelo de infección sigue *S. fredii* HH103 en *cowpea*. En cualquier caso, nuestros resultados están en consonancia con el hecho de que las alteraciones en el LPS tienen un impacto más profundo en el comportamiento simbiótico de *S. fredii* HH103 con diferentes leguminosas hospedadoras que defectos en otros polisacáridos como el EPS o el KPS (revisado en López-Baena *et al.*, 2016). El grado de deterioro simbiótico parece ser

dependiente de la alteración específica y de la leguminosa hospedadora. La inactivación de *lpsB* (que codifica una glicosil transferasa involucrada en la producción de LPS) da lugar a una reducción de la nodulación con soja y *cowpea* y a senescencia prematura de los nódulos fijadores formados (Margaret *et al.*, 2013). Los mutantes de *S. fredii* HH103 en la región *rkp-3* (afectados en KPS y LPS) están igualmente afectados en la simbiosis con estas dos plantas hospedadoras y solamente inducen la formación de pseudonódulos (Margaret *et al.*, 2012). Por lo tanto, y hasta la fecha, el derivado *lpsL* es el mutante afectado en LPS más severamente dañado en simbiosis, ya que induce la formación de pseudonódulos en soja pero no en *cowpea*. Curiosamente, y acorde con nuestros resultados, mutantes *rkpK* y *lpsL* de *S. meliloti* AK631 (un derivado *exoB* de Rm41) también dan lugar a un fenotipo Inf⁻ (nódulos inefectivos sin bacterias) en alfalfa, una leguminosa formadora de nódulos indeterminados (Keretz *et al.*, 1998). En *S. meliloti*, KPS y EPS pueden ser reemplazados uno por el otro para dar lugar a una nodulación efectiva en alfalfa, y debido a ello, la ausencia simultánea de KPS y EPS en el mutante *rkpK* de AK631 da lugar a un fenotipo Inf⁻. Sin embargo, el mutante *lpsL* de AK631, aunque carece de EPS, tiene un KPS simbióticamente activo, lo cual sugiere que su defecto simbiótico se debe al LPS alterado. Además, un mutante *lpsL* de *S. meliloti* 1021, aunque es capaz de inducir nódulos fijadores de nitrógeno en alfalfa, está muy dañado en su interacción con esta planta (Keating *et al.*, 2002). De hecho, los tubos de infección formados cuando se inoculan las raíces de alfalfa con este mutante aparecen alterados y se abortan de forma prematura.

Atendiendo a los resultados mostrados, permanece abierta una pregunta importante: ¿Por qué el fenotipo simbiótico de los mutantes en la región *rkp-2* de *S. fredii* HH103 es tan diferente si ambos muestran alteraciones en el LPS? Aunque el LPS de estos mutantes muestran un patrón electroforético similar y ninguno es reconocido por el anticuerpo monoclonal NB6-228.22, probablemente presenten diferentes alteraciones. Para dilucidar este punto, es necesario conocer la estructura química del LPS de la estirpe parental y el de los mutantes de la región *rkp-2*. Nuestro grupo está trabajando actualmente en este tema en colaboración con el Dr. Rodríguez Carvajal (Dpto. Química Orgánica, Universidad de Sevilla) y los primeros resultados indican claramente la presencia de ácidos galacturónicos y glucurónicos en el LPS de HH103. Teniendo en

cuenta que RkpK podría ser el responsable de la producción de ácido glucurónico a partir de glucosa y LpsL podría producir ácido galacturónico a partir de ácido glucurónico, la ausencia de *rkpK* podría hacer que el LPS careciera de ambos ácidos urónicos, mientras que la inactivación de *lpsL* provocaría que el LPS tuviese ácido glucurónico, pero no galacturónico. La naturaleza exacta de la alteración puede ser extremadamente importante en las moléculas señal. Un buen ejemplo es el trabajo reciente de Kelly y colaboradores (2013) y Kawaharada y colaboradores (2015), quienes demostraron que formas truncadas del EPS de *Mesorhizobium loti* son más perjudiciales para la nodulación con *L. japonicus* que la ausencia completa de la producción de EPS por parte de la bacteria. Otro hecho interesante es que, al menos en *S. fredii* HH103, la tasa transcripcional de *rkpK* es mucho mayor que la de *lpsL*. La razón para esta diferencia podría ser debida al mayor requerimiento de ácido glucurónico que de ácido galacturónico, teniendo en cuenta los principales polisacáridos superficiales: el ácido glucurónico es un componente tanto del LPS como del EPS mientras que el ácido galacturónico sólo está presente en el LPS.

Previamente se han publicado diferentes estudios sobre genes de HH103 cuya mutación o sobre-expresión tiene diferentes efectos en el desarrollo de la simbiosis con soja y *cowpea*: *nolR*, *rkpU*, *lpsB*, *exoA* (Vinardell *et al.*, 2004a; Hidalgo *et al.*, 2010; Margaret *et al.*, 2013; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014). Estos resultados constituyen un nuevo ejemplo de cómo la misma alteración molecular tiene diferentes efectos en la interacción con dos plantas hospedadoras diferentes, incluso cuando estas plantas forman el mismo tipo de nódulo (determinado). En otras palabras, la relevancia simbiótica de cada molécula señal parece estar más relacionada con la interacción bacteria-leguminosa concreta que con el tipo de nódulo, determinado o indeterminado, formado por la planta.

Capítulo II. Estudio de la relevancia simbiótica de los polisacáridos superficiales de *S. fredii* HH103 con *L. japonicus* Gifu y *L. burtii**

1. Introducción

Las estirpes de *S. fredii* son capaces de nodular plantas del género *Glycine* y *Lotus* (Pueppke y Broughton, 1999), lo que ofrece la posibilidad de llevar a cabo estudios de nodulación comparativos entre estas dos leguminosas. *S. fredii* HH103 induce la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en raíces de *L. burtii*, pero sólo da lugar a nódulos inefectivos en *L. japonicus* ecotipos Gifu y Miyakojima MG-20 (Sandal *et al.*, 2012).

Además del papel de los factores de nodulación (NF) en la simbiosis de *Mesorhizobium loti* con su hospedador simbiótico *L. japonicus* (Bek *et al.*, 2010; Sullivan *et al.*, 1995; Sullivan y Ronson, 1998), los polisacáridos superficiales bacterianos pueden desempeñar un papel importante como señales simbióticas (Downie, 2010). El exopolisacárido (EPS) juega un papel en la señalización tanto en la iniciación de los tubos de infección (TI) como en la liberación de las bacterias, además de determinar la compatibilidad simbiótica a través del receptor de la planta *Epr3* (Kelly *et al.*, 2013; Kawaharada *et al.*, 2015, Kawaharada *et al.*, 2017). Los glucanos cíclicos (GC) también se requieren para una simbiosis efectiva, ya que un mutante en el gen *cgs*, que no produce GC, es incapaz de infectar raíces de *L. tenuis* (D'Antuono *et al.*, 2005). La información del polisacárido capsular (KPS) es muy limitada y no hay evidencias de que tenga un papel simbiótico (Townsend *et al.*, 2006; Townsend y Keating, 2008). En cuanto al lipopolisacárido (LPS), los mutantes estudiados, afectados en el antígeno O, siguen siendo capaces de formar nódulos efectivos en plantas de *Lotus*, aunque muestran una reducción de la capacidad competitiva en comparación con la estirpe silvestre (D'Antuono *et al.*, 2005).

En este capítulo se describe el fenotipo simbiótico de una colección de mutantes en *S. fredii* HH103 afectados en la producción de diferentes polisacáridos superficiales con las leguminosas modelo *L. japonicus* y *L. burtii*. Además, se demuestra que el sistema de

infección de *S. fredii* HH103 se realiza a través del sistema de infección *crack entry*, mientras que *M. loti* MAFF303099 lo hace a través de TI.

* La mayoría de los resultados expuestos en este capítulo han sido publicados en la revista Molecular Plant-Microbe Interactions:

Acosta-Jurado, S., Rodríguez-Navarro, D.N., Kawaharada, Y., Perea, J.F., Gil-Serrano, A., Jin, H., An Q, Rodríguez-Carvajal, M.A., Andersen, S.U., Sandal, N., Stougaard, J., Vinardell, J.M., Ruiz-Sainz, J.E. 2016. *Sinorhizobium fredii* HH103 Invades *Lotus burtii* by Crack Entry in a Nod Factor-and Surface Polysaccharide-Dependent Manner. Mol Plant Microbe Interact. 29:925-937.

2. Resultados

En esta tesis hemos llevado a cabo ensayos de nodulación con *L. japonicus* y *L. burttii* para investigar la capacidad simbiótica de diversos mutantes de *S. fredii* HH103 afectados en cuatro polisacáridos superficiales (EPS, KPS, LPS y GC). En estudios previos, hemos comprobado que estos polisacáridos desempeñan papeles importantes, a veces esenciales, en al menos en alguna de las interacciones de esta estirpe con sus leguminosas hospedadoras (López-Baena *et al.*, 2016). En la **figura 28** se resumen las estructuras químicas de estos polisacáridos y las regiones genéticas afectadas en cada uno de los mutantes testados. Para cada mutante se llevaron a cabo al menos dos ensayos de nodulación independientes.

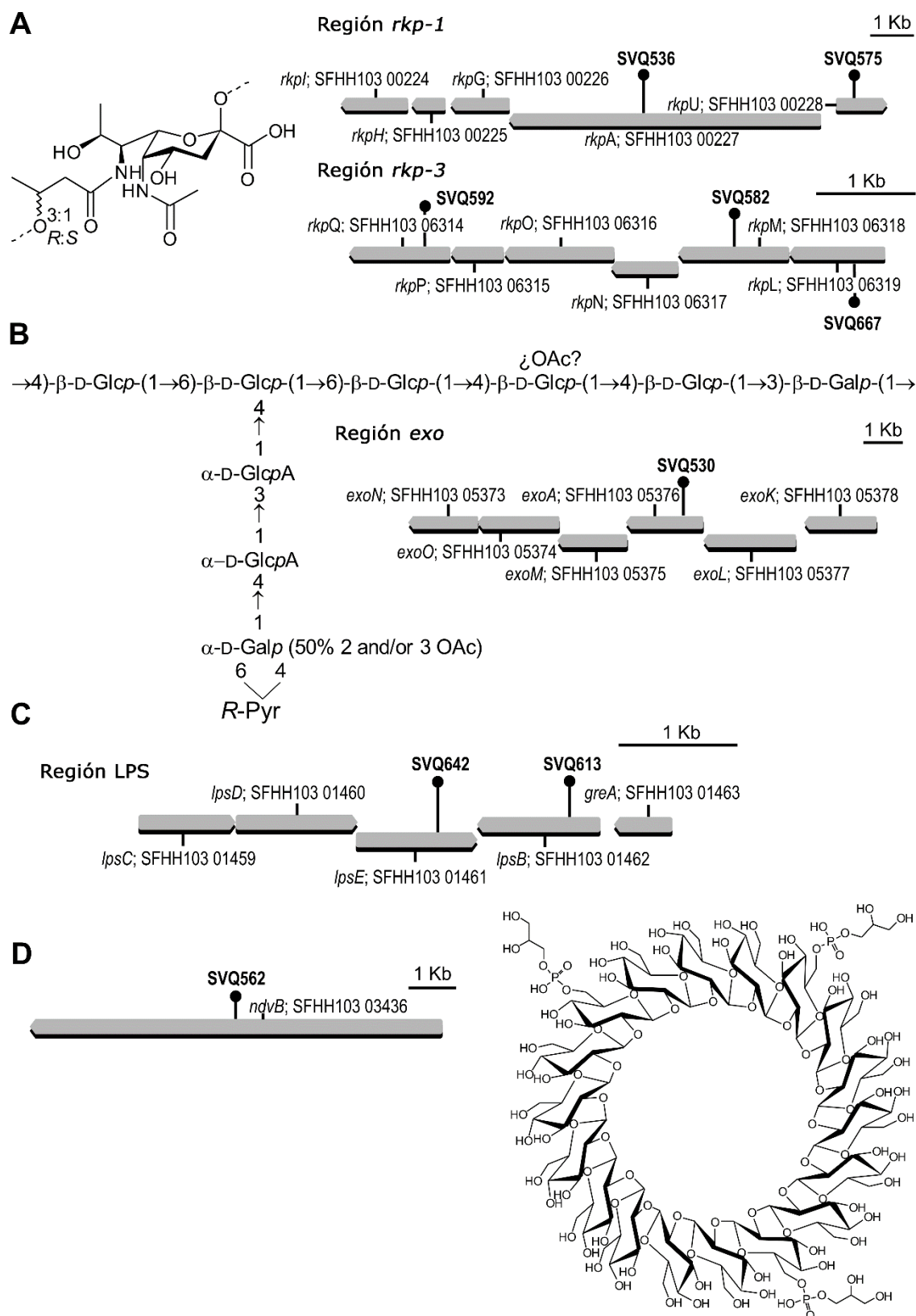


Figura 28. Estructura química de los polisacáridos superficiales y mapa de los genes mutados estudiados en este capítulo. **A:** estructura química de la unidad de repetición del KPS y los genes de la región *rkp-1* y *rkp-3*. **B:** Estructura química de la unidad de repetición del EPS y un fragmento de la región *exo* que contiene el gen *exoA*. **C:** Organización genética de la región *lpsCDElpsBgrea*. **D:** Estructura química de un GC compuesto por 18 residuos de glucosa en el que no se ha determinado la posición de los sustituyentes. (Acosta-Jurado *et al.*, 2016c).

2.1. Mutantes en la producción de EPS

Para el estudio de la relevancia del EPS en la simbiosis de *S. fredii* HH103 con *Lotus*, se usó un mutante en el gen *exoA* (llamado SVQ530), incapaz de producir EPS. En soja este mutante no muestra ningún defecto en simbiosis, e incluso es más competitivo que la estirpe silvestre (Parada *et al.* 2006; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014). SVQ530 dio lugar a nódulos fijadores de nitrógeno en raíces de *L. burtii* (**Tabla 11, figura 31**, panel B). El desarrollo de las plantas (expresado como la longitud de la parte aérea las plantas) inoculadas con este mutante ($15,0 \pm 0,9$ cm) fue similar al de las plantas inoculadas con la estirpe silvestre ($14,6 \pm 0,7$ cm) 59 días después de la inoculación (dpi). De igual modo, los números de nódulos inducidos por la estirpe silvestre ($26,3 \pm 2,1$) y por el mutante *exoA* ($28,5 \pm 12,8$) fueron muy parecidos. El tamaño de las plantas control sin inocular alcanzó una media de $2,1 \pm 0,7$ cm. En cuanto a la cinética de nodulación, las plantas inoculadas con el mutante *exoA* mostraron una tasa de nodulación similar a la estirpe parental a los 35 dpi (**Figura 30**, panel A). Al igual que la estirpe silvestre, este mutante no desarrolló nódulos fijadores de nitrógeno en plantas de *L. japonicus* Gifu, aunque algunas desarrollaron abultamientos de tipo macroscópico (MRO, del inglés, *Macroscopic Root outgrowths*).

2.2. Mutantes afectados en EPS y LPS

La inactivación del gen *rkpK* (SVQ703) de la región *rkp-2* provoca alteraciones en el patrón electroforético del LPS observado mediante SDS-PAGE, y además no produce EPS (**Tabla 11, figura 29**, Capítulo 1, Acosta-Jurado *et al.*, 2017). En soja, este mutante no presenta defectos simbióticos (Capítulo 1, Acosta-Jurado *et al.*, 2017). La respuesta de *L. burtii* a la inoculación con este mutante fue igual que la de las plantas inoculadas con la estirpe parental HH103 (**Figura 31**, panel F). No hubo diferencias ni en el número de nódulos formados por planta ($23,5 \pm 1,2$ vs $22,2 \pm 3,2$, respectivamente) ni en el tamaño de la parte aérea de las plantas ($14,2 \pm 1,0$ y $17,0 \pm 2,0$ cm, respectivamente) a los 59 dpi. Las plantas de *L. japonicus* Gifu inoculadas con este mutante sólo desarrollaron MRO, al igual que las inoculadas con la estirpe silvestre.

2.3. Mutantes afectados en el KPS

Al inicio de esta Tesis, nuestro grupo disponía de dos grupos de mutantes afectados en la producción de KPS: el primero está constituido por mutantes incapaces de sintetizar

este polisacárido, pero no afectados en la producción de otros polisacáridos superficiales; el segundo está formado por estirpes que además de no producir KPS presentan alteraciones en el LPS (ver siguiente apartado).

Como representante del primer grupo, se usó la estirpe SVQ536, afectada en un gen, *rkpA*, perteneciente a la región *rkp-1* (**Figura 28**). En soja, este mutante induce un número de nódulos fijadores significativamente inferior al de la estirpe silvestre (Margaret-Oliver *et al.*, 2012). En *L. burttii*, el mutante *rkpA* presentó un fenotipo Nod⁺Fix⁺ (**Tabla 11**, **Figura 31**, panel C). Tanto la cinética de nodulación (**Figura 30**, panel B) como el número de nódulos formados en las plantas inoculadas con el mutante *rkpA* ($22,0 \pm 2,1$) o con la estirpe parental HH103 ($26,3 \pm 2,1$) fueron similares, dando lugar a plantas con alturas similares ($11,5 \pm 1,3$ y $14,5 \pm 1,0$ cm, respectivamente). Igualmente, el fenotipo del mutante *rkpA* en *L. japonicus* Gifu fue igual al de HH103 ya que sólo indujo la formación de estructuras de tipo MRO.

2.4. Mutantes afectados en KPS y LPS

La mutación en el gen *rkpU* (SVQ575), perteneciente a la región *rkp-1* de *S. fredii* HH103, provoca ligeras alteraciones en el patrón electroforético del LPS y además suprime la producción de KPS. Las alteraciones que se producen en el LPS no se producen en cultivos de 3 pero sí de 5 días (**Figura 29**; Hidalgo *et al.*, 2010). El fenotipo simbiótico en soja de este mutante es similar al del mutante en *rkpA*: nodulación reducida. Las plantas de *L. burttii* inoculadas con SVQ575 alcanzaron una altura similar a las plantas inoculadas con la estirpe parental y también un número similar de nódulos ($13,3 \pm 1,0$ cm vs $14,5 \pm 1$ cm y $24,8 \pm 7,8$ vs $26,3 \pm 2,1$) (**Figura 31**, panel D).

La región *rkp-3* de *S. fredii* HH103 está implicada en la síntesis del derivado de ácido pseudoamínico que constituye la subunidad repetitiva del KPS de esta estirpe (Margaret *et al.*, 2012). Las mutaciones en los genes de esta región abolen la síntesis de KPS y provocan modificaciones en la estructura del LPS que alteran su patrón electroforético y su reconocimiento por anticuerpos (**Figura 29**). Estos mutantes están gravemente afectados en soja, donde sólo originan la formación de pseudonódulos. En esta tesis hemos estudiado el comportamiento simbiótico con *Lotus* de uno de los mutantes en esta región, concretamente SVQ582 afectado en el gen *rkpM*. Aunque este mutante induce la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en plantas de *L. burttii* (**Tabla 11**,

Figura 31, panel G), muestra un retraso en la cinética de nodulación en comparación con HH103, aunque a 36 dpi, el número de nódulos formados por ambos es similar (**Figura 30**). Asimismo, a los 56 dpi, tanto la nodulación ($15,7 \pm 3,3$ nódulos por planta) como la altura de la parte aérea de las plantas ($9,3 \pm 3,1$) de *L. burttii* inoculadas con el mutante *rkpM*, se vieron afectadas en comparación con las de las plantas inoculadas con la estirpe parental ($22,2 \pm 3,2$ nódulos por planta; $14,5 \pm 1,0$ cm de altura). Este fenotipo se corroboró con otro ensayo de nodulación (64 dpi), en el cual el peso fresco de las plantas inoculadas con SVQ582 fue del 44% en comparación con las inoculadas con HH103 ($213,7 \pm 92,0$ vs $489,8 \pm 98,7$ mg). Otro mutante de la región *rkp-3*, SVQ592, afectado en *rkpQ*, mostró un fenotipo simbiótico con *L. burttii* similar al de SVQ582 ($4,6 \pm 1,4$ vs $12,5 \pm 6,2$ nódulos en plantas inoculadas con el mutante y con la estirpe parental respectivamente).

Ninguno de los mutantes en genes pertenecientes a las regiones *rkp-1* y *rkp-3* afectados en KPS y LPS, indujeron nódulos formadores de nitrógeno en raíces de *L. japonicus* Gifu, aunque si se visualizaron MRO. Otro de los mutantes analizados en simbiosis con *L. japonicus* Gifu fue SVQ667 (afectado en *rkpL*, perteneciente a la región *rkp-3*, carente de KPS y con alteraciones en el perfil de LPS), el cual tampoco indujo la formación de nódulos fijadores en *L. japonicus* Gifu.

2.5. Mutantes afectados en KPS y EPS

Para ello se empleó un doble mutante afectado en los genes *rkpH* (región *rkp-1*) y *exoA* (Parada *et al.*, 2006). El perfil electroforético de este doble mutante (SVQ535) es similar al de la estirpe parental (Parada *et al.*, 2006). En cuanto a su fenotipo simbiótico con *L. burttii* fue capaz de formar nódulos fijadores de nitrógeno (**Figura 31**, panel E, **Tabla 11**) y la nodulación ($30,2 \pm 12$ nódulos por planta) y el desarrollo de la parte aérea a los 59 días ($13,6 \pm 2,4$ cm) fue similar al de las plantas inoculadas con HH103 ($22,2 \pm 3,2$ nódulos por planta y $14,5 \pm 1,0$ cm). Al igual que en otros mutantes, el doble mutante sólo formó nódulos inefectivos con plantas de *L. japonicus* GIFU.

2.6. Mutantes en LPS

Los genes *lpsB* y *lpsE* de *S. fredii* HH103 son genes contiguos que se transcriben en direcciones opuestas (**Figura 28**). La mutación de estos genes (*lpsB*, SVQ613 y *lpsE*,

SVQ642) origina alteraciones en el LPS que se reflejan en sus patrones electroforéticos cuando se comparan con el de la estirpe parental (Margaret *et al.*, 2013). Esos mutantes están muy afectados en su fenotipo simbiótico con soja, donde inducen un número muy reducido de nódulos fijadores. En los ensayos realizados con *L. burttii*, se comprobó que ambos mutantes también inducen la formación de nódulos fijadores de nitrógeno (**Tabla 11, Figura 31**, panel E). En el caso del mutante *lpsB* se llevaron a cabo estudios más en profundidad, y se observó que presenta un retraso en la nodulación en comparación con HH103 (**Figura 30**, panel D). Además, la altura de las plantas inoculadas con este mutante fue menor que la de aquellas inoculadas con la estirpe silvestre ($9,2 \pm 1,8$ cm vs $14,5 \pm 1,0$ cm). A la luz de estos resultados, se realizó otro test de nodulación en el que se observó que el peso de las plantas inoculadas con el mutante fue del 79% con respecto a las plantas inoculadas con HH103 a los 64 dpi. Ninguno de estos mutantes consiguió formar nódulos fijadores en *L. japonicus* Gifu, aunque se observaron MRO.

Otro de los mutantes afectados en la producción de LPS es el mutante en el gen *lpsL* de la región *rkp-2*. Este mutante muestra un perfil electroforético alterado con respecto al parental (Capítulo 1; Acosta-Jurado *et al.*, 2017) y en cuanto a sus características simbióticas sólo fue capaz de inducir pseudonódulos con plantas de soja y desarrollo de primordios nodulares con *cowpea*. Este mutante también mostró una capacidad simbiótica reducida con plantas de *L. burttii*, dando lugar a plantas con pocos nódulos fijadores ($1,1 \pm 0,8$ nódulos por planta) y un peso fresco de la parte aérea reducido ($23,3 \pm 8,8$ mg) en comparación con la estirpe parental ($8,6 \pm 3,6$ nódulos y $48,0 \pm 17,0$ mg).

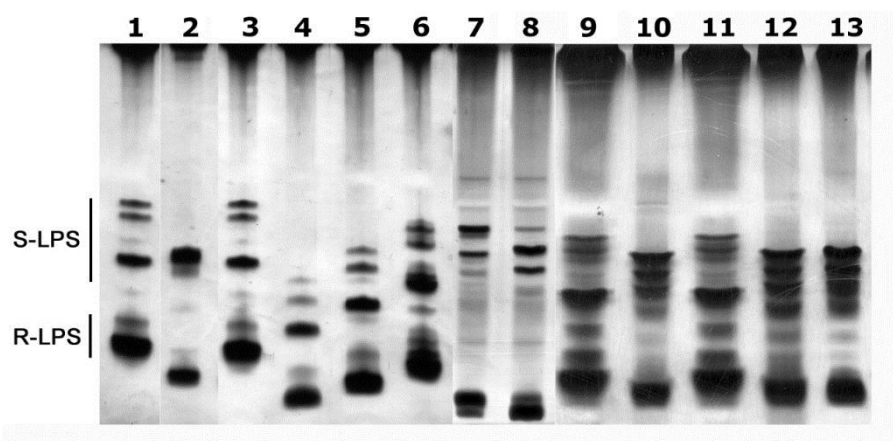


Figura 29. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia de SDS y posterior tinción con plata de LPS de extractos crudos de *S. fredii* HH103 y diversos mutantes afectados en polisacáridos superficiales. En la izquierda se indican las bandas correspondientes al LPS liso y al rugoso (S-LPS y R-LPS). Carriles 1, 3, 7, 9 y 11 HH103, carril 2 mutante *rpkK* (SVQ703), carril 4 mutante *lpsB* (SVQ613), carril 5 mutante *lpsE* (SVQ642), carril 6 mutante *rpkL* (SVQ667), carril 8 mutante *rpkU* (SVQ575), carril 10 mutante *rpkM* (SVQ582), carril 12 mutante *rpkQ* (SVQ592), carril 13 mutante *rpkQ* (SVQ594). Los perfiles de LPS de todos los carriles pertenecen a cultivos de 3 días, excepto los perfiles 7 y 8, que pertenecen a cultivos de 5 días que es el tiempo en el que el perfil de LPS del mutante *rpkU* muestra diferencias con respecto a HH103 (Hidalgo *et al.*, 2010). Esta figura está compuesta por 3 experimentos de PAGE (1-6;7-8;9-13). (Acosta-Jurado *et al.*, 2016c).

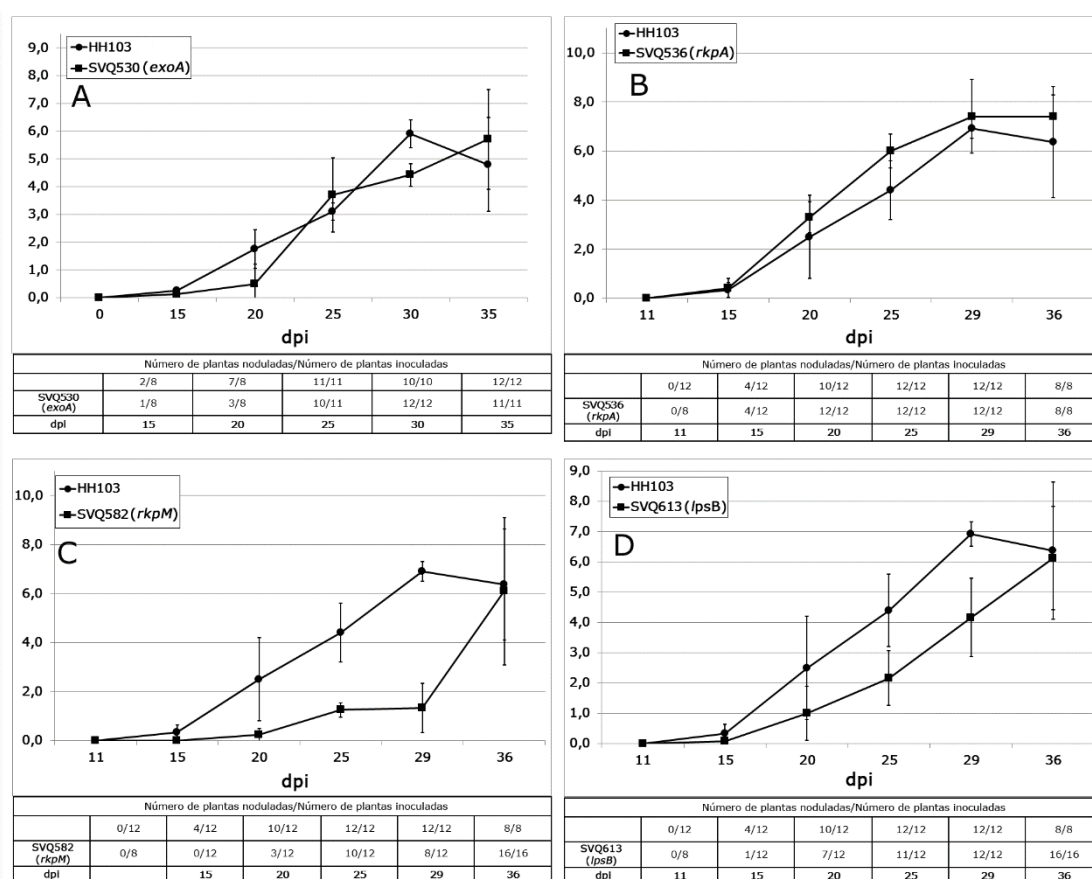


Figura 30. Cinéticas de nodulación de *L. burttii* inoculadas con *S. fredii* HH103 y diversos mutantes afectados en polisacáridos superficiales. A, SVQ530 (*exoA*); B, SVQ536 (*rpkA*); C, SVQ582 (*rpkM*); D, SVQ613 (*lpsB*). Para determinar el número de nódulos en cada punto se analizaron 8-16 plantas. (Acosta-Jurado *et al.*, 2016c).

2.7. Mutantes en GC

En este caso se inocularon plantas de *L. burttii* con el mutante afectado en el gen *cgs* (también llamado *ndvB*, SVQ562), el cual es incapaz de producir GC y a su vez da lugar a una sobreproducción de EPS. Este mutante sólo forma nódulos inefectivos en plantas de soja (Crespo-Rivas *et al.*, 2009) y, como se esperaba, sólo formó MRO y nódulos inefectivos en *L. japonicus* Gifu y en *L. burttii*, de donde no se aisló ninguna bacteria (**Figura 31**, panel K, **Tabla 11**).

Tabla 11. Respuesta de *L. burtii* y *L. japonicus* Gifu a la inoculación con mutantes de *S. fredii* HH103 afectados en los polisacáridos superficiales y *M. loti* NZP2235.

Estirpe, gen mutado (1)	Polisacárido superficial afectado (2)	Fenotipo simbiótico (3)			
		<i>L. burtii</i>	<i>G. max</i>	<i>V. unguiculata</i>	<i>C. cajan</i>
HH103-Rif ^r	EPS, KPS, LPS y GC silvestres	Nod ⁺ Fix ⁺	Nod ⁺ Fix ⁺	Nod ⁺ Fix ⁺	Nod ⁺ Fix ⁺
SVQ530, <i>exoA</i>	EPS ⁻	Nod ⁺ Fix ⁺	Nod ⁺ Fix ⁺	Nod ⁺ Fix ⁺	Nod ⁺ Fix ⁺
SVQ536, <i>rkpA</i>	KPS ⁻	Nod ⁺ Fix ⁺	Reducción nódulos Nod ⁺ Fix ⁺ , pseudonódulos	N.T.	N.T.
SVQ575, <i>rkpU</i>	KPS ⁻ LPS*	Nod ⁺ Fix ⁺	Reducción nódulos Nod ⁺ Fix ⁺ , pseudonódulos	Nod ⁺ Fix ⁺	N.T.
SVQ535, <i>exoA rkpH</i>	EPS ⁻ KPS ⁻	Nod ⁺ Fix ⁺	Reducción nódulos Nod ⁺ Fix ⁺ , pseudonódulos	Nod ⁺ Fix ⁺	Reducción nódulos Nod ⁺ Fix ⁺ , pseudonódulos
SVQ582 <i>rkpM</i>	KPS ⁻ LPS*	Nod ^R Fix ^R	Pseudonódulos, Fix ⁻ (SVQ581)	Pseudonódulos, Fix ⁻ (SVQ581)	Pseudonódulos, Fix ⁻
SVQ594, <i>rkpQ</i>	KPS ⁻ LPS*	Nod ^R Fix ^R	Pseudonódulos, Fix ⁻	Pseudonódulos, Fix ⁻	Pseudonódulos, Fix ⁻
SVQ703, <i>rkpK</i>	EPS ⁻ LPS*	Nod ⁺ Fix ⁺	Nod ⁺ Fix ⁺	Reducción nódulos Nod ⁺ Fix ⁺	N.T.
SVQ763, <i>lpsL</i>	LPS*	Nod ^R Fix ^R	pseudonódulos	Nod ⁻	N.T.
SVQ613, <i>lpsB</i>	LPS*	Nod ⁺ Fix ^{R*}	Reducción nódulos Nod ⁺ Fix ⁺ , pseudonódulos	Reducción nódulos Nod ⁺ Fix ⁺	N.T.
SVQ642, <i>lpsE</i>	LPS*	Nod ⁺ Fix ^R	Reducción nódulos Nod ⁺ Fix ⁺ , pseudonódulos	N.T.	N.T.
SVQ562, <i>cgs</i>	CG ⁻ EPS ^{++§}	MRO y nódulos inefectivos	Pseudonodulos, Fix ⁻	Nod ⁻ Fix ⁻ , sin respuesta macroscópica	N.T.

<i>M. loti</i> NZIP2235	Wild type	Nod ⁺ Fix ⁺	N.D.	N.D.	N.D.
----------------------------	-----------	-----------------------------------	------	------	------

(1) Las mutaciones se llevaron a cabo por la inserción del casete *lacZ*Δp-Gm^R o el interposón omega (Ω).

(2) EPS⁻, el EPS no se produce; KPS⁻, el KPS no se produce; LPS*, El perfil electroforético del LPS está alterado en comparación con el de HH103; la alteración del perfil de LPS varía entre los mutantes analizados. GC⁻, los GC no se producen. EPS^{++g}, el mutante sobre-produce EPS de alto peso molecular y porta niveles altos de sustituyentes de piruvatos y acetatos en comparación con HH103.

(3) Los fenotipos simbióticos con *L. burttii* y *L. japonicus* Gifu se han determinado a partir de al menos dos experimentos independientes. Nod⁺Fix⁺, se han formado nódulos fijadores de nitrógeno y el desarrollo de la planta (medido como tamaño de la planta o peso fresco de la parte aérea) era similar a aquellas inoculadas con *S. fredii* HH103. Nod^RFix^R, el número de nódulos y el desarrollo de la planta significativamente menor (α=5%) que las obtenidas con HH103. Nod⁺Fix^R*, El número de nódulos es similar pero el desarrollo de las plantas está significativamente reducido y se obtuvieron diferencias estadísticas en al menos en un experimento (α=5%). Las raíces que forman nódulos inefectivos (Fix⁻) pueden mostrar MRO que varían desde *elongated root zones* a estructuras hemisféricas (Figura XX, paneles XX). Muchos de los nódulos inducidos en *L. burttii* eran rosas pero también se pudieron observar nódulos verdes o blancos. Las plantas se crecieron en jarros Leonard. Los fenotipos simbióticos se analizaron entre 6-9 semanas después de la inoculación. N.D. datos no disponibles. N.T. no testado. En el caso del mutante *rkpM* se usó el derivado mutado con el casete *lacZ*-Gm^R, mientras que en los estudios anteriores se usó el derivado que contenía el interposón Ω. Tanto *S. fredii* HH103 como los diferentes mutantes testados sólo indujeron MRO en *L. japonicus*. Todos los fenotipos testados en anteriores estudios se recogen en López-Baena *et al.*, 2016.

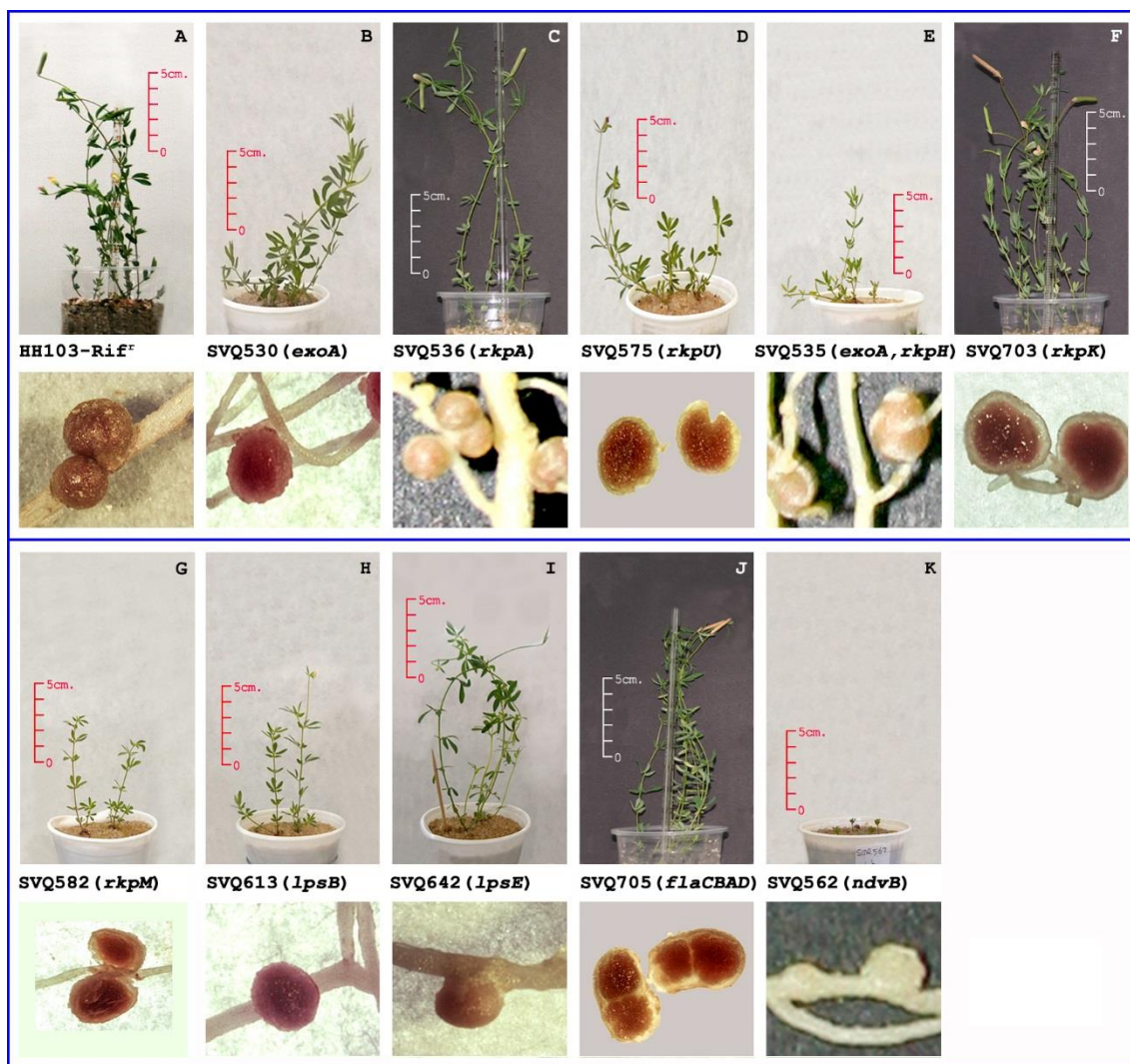


Figura 31. Plantas y nódulos de *L. burtii* inoculadas con *S. fredii* HH103 y los diferentes mutantes afectados en los polisacáridos. **A.** *S. fredii* HH103; **B** SVQ530 (*exoA*); **C**, SVQ536 (*rkpA*); **D**, SVQ575 (*rkpU*); **E**, SVQ535 (*exoA rkpH*), **F**, SVQ703, (*rkpK*); **G**, SVQ582 (*rkpM*); **H**, SVQ613 (*lpsB*); **I**, SVQ642 (*lpsE*); **J**, SVQ705 (*flaCBAD*); **K**, SVQ562 (*ndvB*). El diámetro de un nódulo fijador, bien desarrollado de *L. burtii* con *M. loti* fue de 1.6 ± 0.3 mm. (Acosta-Jurado *et al.*, 2016c).

2.8. Análisis microscópicos de raíces de *L. burtii* inoculadas con *S. fredii* HH103

En publicaciones anteriores se ha demostrado que el EPS, el KPS o un LPS intacto son, a menudo, componentes necesarios para la formación de nódulos efectivos en al menos una interacción rizobio-leguminosa en particular (Krol y Becker, 2009). Ya que la deficiencia simbiótica de los mutantes de *S. fredii* HH103 en KPS y LPS son más severas con *G. max* que con *L. burtii* (**Tabla 11**), se investigó como infecta *S. fredii* HH103 las raíces de *L. burtii*. Para ello, se llevaron a cabo análisis de microscopía confocal con plantas de *L. burtii* a las 2-3 semanas de ser inoculadas con *S. fredii* HH103 portando el plásmido pFAJDsRed (Kelly *et al.*, 2013). Estos estudios se realizaron en colaboración con

el Dr. Yasuyuki Kawaharada (Aarhus University, Dianamarca). Los resultados mostraron que *S. fredii* HH103 forma microcolonias en los pelos radicales curvados y además raramente se encuentran TI iniciados (**Figura 32**) y ninguno en progresión. Además, se contaron los TI de las plantas de *L. burtii* y *L. japonicus* Gifu inoculados con *S. fredii* HH103 siendo éstos prácticamente nulos (**Figura 33**). Por el contrario, *M. loti* MAFF303099 (Maekawa *et al.*, 2009) infecta las raíces de *L. burtii* mediante la formación de TI (**Figura 32**, paneles J y K). Además, en secciones obtenidas por vibratomo de raíces infectadas con HH103 se pudieron observar “bolsillos” de infección asociados con el *crack entry* en los nódulos (**Figura 32**, paneles D y E). Asimismo, las células de *S. fredii* HH103 se encontraron en espacios localizados entre las células del nódulo (**Figura 32**, paneles E y G). Por lo tanto, la infección de las raíces de *L. burtii* por parte de *S. fredii* HH103 se lleva a cabo mediante *crack entry* en contraste con la entrada por TI de *M. loti* (**Figura 32**).

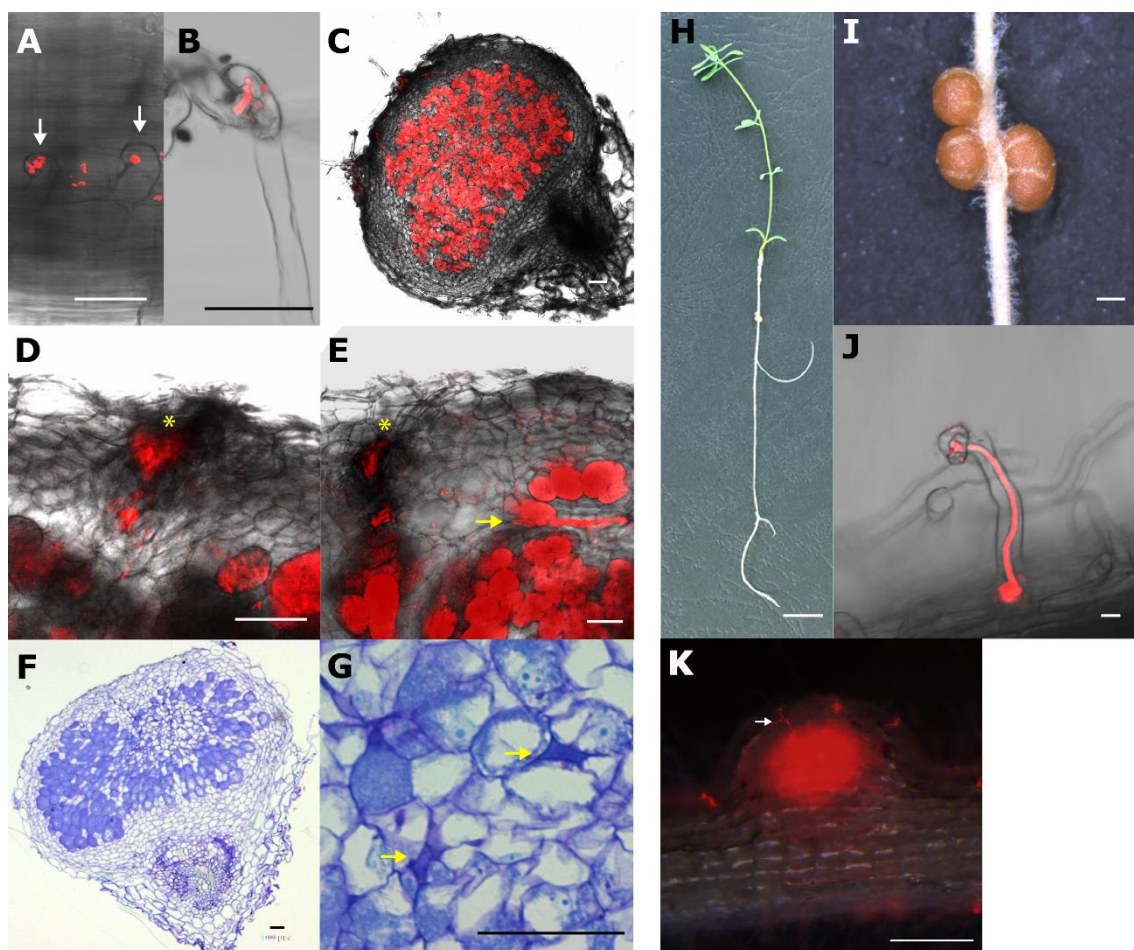


Figura 32. Fenotipo simbiótico de *L. burtii* inoculado con *S. fredii* HH103 (A-G) y *M. loti* MAFF303099 (H-K). (A-B) Colonias de *S. fredii* HH103 DsRed en los pelos radicales curvados a las 2 semanas de la

inoculación (A) y en TI tempranos a las 3 semanas después de la inoculación (B). **(C-G)** Secciones de nódulos de *L. burtii* a las 2-4 semanas después de la inoculación con *S. fredii* HH103 DsRed. En el panel **A**, las flechas blancas muestran las microcolonias de *S. fredii* HH103. Las estrellas amarillas (paneles D y E) muestran la zona donde se ha producido el *crack entry*. Las flechas amarillas (paneles E y G) muestran bacterias que colonizan espacios intercelulares del nódulo. Las barras son 50 μ m en A-G. **(H-K)** Plantas de *L. burtii* a las 3 semanas después de la inoculación con *M. loti* MAFF303099 DsRed. **(H)** Planta completa de *L. burtii*, **(I)** nódulos, **(J)** tubo de infección. **(K)** Tubos de infección elongados desde el pelo radical al nódulo de *L. burtii* inoculado con *M. loti* MAFF303099 DsRed a los 9 días después de la inoculación (uno de ellos está señalado con una flecha blanca). Las barras de la escala son 1 cm en H, 1 mm en I, 10 μ m en J y 500 μ m en K. (Acosta-Jurado et al. 2016c).

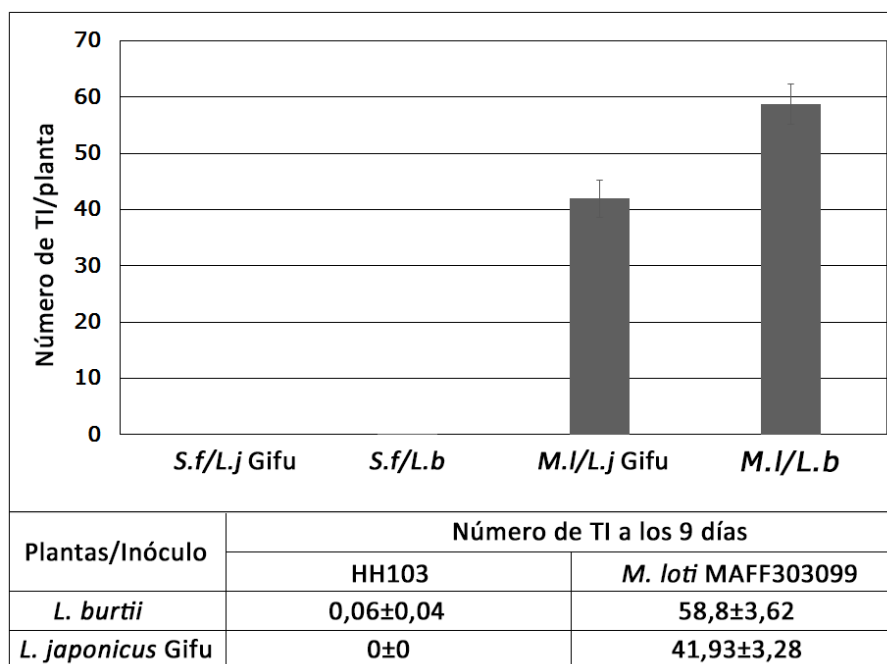


Figura 33. Número de TI en los pelos radicales de *L. japonicus* Gifu y *L. burtii* 9 días después de la inoculación con *S. fredii* HH103 DsRed (columnas 1 y 2, respectivamente) o *M. loti* MAFF303099 DsRed (columnas 3 y 4, respectivamente). El número de plantas de *L. japonicus* Gifu y *L. burtii* inoculadas con *S. fredii* HH103 DsRed fue de 50 y 54. Para *M. loti* MAFF303099 DsRed se inocularon 15 plantas de *L. japonicus* Gifu y *L. burtii*. (Acosta-Jurado et al. 2016c).

2.9. El flagelo bacteriano no se requiere para la infección por *crack entry*

Para investigar si la movilidad dependiente de flagelo se requiere para que *S. fredii* HH103 invada las raíces de *L. burtii* a través de *crack entry*, se construyó un mutante desprovisto de flagelo mediante la delección de los genes *flaCBAD* (SVQ705). Este mutante no mostró movilidad de tipo *swimming* en medio Bromfield semisólido (**Figura 34**). Sin embargo, los ensayos de nodulación mostraron que el mutante Δ *flaCBAD* indujo un número similar de nódulos fijadores de nitrógeno en plantas de *L. burtii* (18,4±3,8) (**Figura 31**, panel J) con respecto a la estirpe parental (21,7±8,7). Los pesos frescos de la

parte aérea de las plantas también fueron similares ($266,6 \pm 173,9$ mg para HH103 vs $239,4 \pm 126,8$ mg para el mutante $\Delta flaCBAD$).

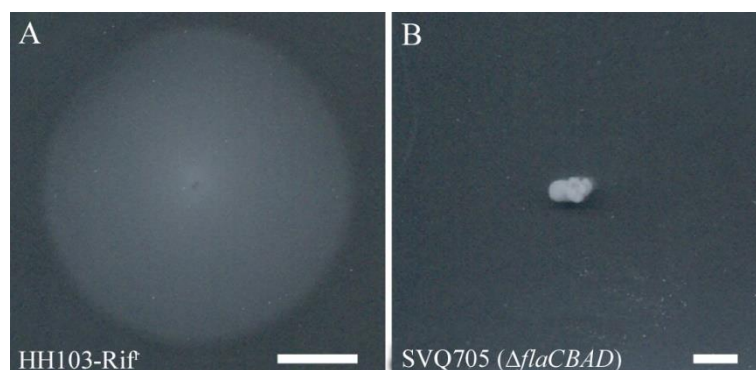


Figura 34. Movilidad *swimming* de *S. fredii* HH103 y el mutante *flaCBAD*. Los cultivos se incubaron durante 4 días en medio Bromfield 0,24% de agar m/v. Las barras se corresponden con 1 cm para HH103 y 0,4 cm para SVQ705. (Acosta-Jurado et al. 2016c).

3. Discusión

L. burttii y la leguminosa modelo *L. japonicus* son noduladas principalmente por estirpes rizobianas pertenecientes a la especie *Mesorhizobium loti*. *S. fredii* HH103 nodula un amplio rango de leguminosas que incluye a *L. burttii* (Margaret *et al.*, 2011; Sandal *et al.*, 2012). Algunas de las plantas hospedadoras de *S. fredii* HH103 forman nódulos determinados, mientras que otras desarrollan nódulos indeterminados. Debido a su amplia capacidad simbiótica, *S. fredii* HH103 es especialmente apropiada para estudios dirigidos para determinar cuáles de las estructuras bacterianas o señales químicas, o combinaciones de las mismas, son relevantes para la simbiosis con una leguminosa particular.

En este capítulo se han investigado las propiedades simbióticas de mutantes de *S. fredii* HH103 afectadas en la biosíntesis de polisacáridos superficiales con *L. burttii* y *L. japonicus*. Los estudios con *L. burttii* se realizaron con el propósito de determinar qué polisacáridos superficiales de *S. fredii* HH103 son importantes o incluso indispensables para una simbiosis exitosa entre *L. burttii* y *S. fredii* HH103. Por el contrario, los estudios realizados con *L. japonicus* Gifu se llevaron a cabo para investigar si la eliminación o alteración de algún polisacárido superficial permitía la nodulación de *S. fredii* HH103 con esta leguminosa. Todos los mutantes en polisacáridos superficiales testados aquí se han investigado anteriormente en su capacidad simbiótica con *G. max* (López-Baena *et al.*, 2016), lo que permite establecer comparaciones simbióticas con *L. burttii*.

El mutante incapaz de producir EPS (mutante *exoA*) no muestra deficiencias en la nodulación con soja (Parada *et al.*, 2006). En lugar de ello, este mutante mejora la capacidad competitiva para nodular esta planta (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014). Tanto *S. fredii* HH103 como su derivado *exoA* parecen tener la misma capacidad simbiótica con *L. burttii*, lo que indica que el EPS podría no tener ningún papel significativo en esta interacción simbiótica. El EPS de *S. fredii* HH103 se compone de glucosa, galactosa y ácido glucurónico (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014), mientras que el de *M. loti* R7A también contiene ácido riburónico (Kelly *et al.*, 2013; Muszyński *et al.*, 2016). Como se ha comentado previamente, recientemente se ha descrito el receptor EPR3 de *L. japonicus*, que controla la infección y es capaz de discriminar EPS compatibles o no y, por tanto, la formación de nódulos fijadores de nitrógeno (Kawaharada *et al.*, 2015,

2017). El receptor EPR3 de *L. japonicus* podría reconocer el EPS de *S. fredii* HH103 como no compatible, lo que impediría el desarrollo de nódulos invadidos en esta interacción. Sin embargo, una hipotética incompatibilidad mediada por EPS no podría explicar completamente la ineffectividad de la interacción entre *S. fredii* HH103 y *L. japonicus*, debido a que el mutante *exoA*, que no produce EPS, no ha ganado la capacidad de nodulación con esta leguminosa.

En cuanto al KPS, se han empleado dos mutantes afectados en la región *rkp-1*, y ninguno de ellos ha mostrado deficiencias simbióticas con *L. burttii*. *rkpA* pertenece a un operón de 5 genes (*rkpA*, *rkpG*, *rkpH*, *rkpI*, y *rkpJ*) contiguos y que se transcriben en dirección opuesta a *rkpU* (**Figura 28**). El gen *rkpA* codifica para una 2-amino-3-quetobutiratoCoA-ligasa, mientras que *rkpU* codifica para una proteína relacionada con la exportación del polisacárido capsular (Hidalgo *et al.*, 2010; Margaret-Oliver *et al.*, 2012). El mutante en *rkpA* no muestra ninguna alteración apreciable en el perfil electroforético de LPS (Margaret-Oliver *et al.*, 2012). Por lo tanto, la ausencia sólo del KPS en este mutante no provoca ninguna deficiencia severa en esta leguminosa.

El mutante en el gen *rkpU* muestra ligeras variaciones en el perfil de LPS, pero sólo cuando los cultivos bacterianos alcanzan 5 días (Hidalgo *et al.*, 2010), lo cual corresponde con la fase estacionaria tardía. Típicamente la edad de los inóculos usados en los ensayos con *Lotus* (2-3 días) corresponde a fase estacionaria temprana, momento en el cual el mutante en *rkpU* no muestra variaciones en su LPS (Hidalgo *et al.*, 2010). Todos estos resultados sugieren que las alteraciones en el perfil de LPS mostradas por el derivado *rkpU* no son relevantes para la interacción simbiótica entre *S. fredii* HH103 y *L. burttii* o que estas alteraciones no están presentes en los inoculantes con 2-3 días. En resumen, los mutantes de *S. fredii* HH103 en la región *rkp-1* están simbióticamente afectados con soja (Hidalgo *et al.*, 2010; Margaret *et al.*, 2012; Parada *et al.*, 2006) pero no con *L. burttii* (**Tabla 11**).

Por el contrario, el mutante afectado en la región *rkp-3*, concretamente en el gen *rkpM* y que es incapaz de producir KPS, estaba afectado negativamente en el nº final de nódulos fijadores de nitrógeno formado por *L. burttii* (**Tabla 11**) y presentó un retraso en la cinética de nodulación en comparación con la estirpe parental (**Figura 30**, panel C). El patrón electroforético del LPS de este mutante está claramente alterado en

comparación con el de HH103 (Margaret *et al.*, 2012), y estas alteraciones son diferentes a las mostradas por el mutante *rkpU*. Concretamente, las bandas del LPS del mutante *rkpM* mostraron mayor velocidad electroforética que las del mutante *rkpU* y las de la estirpe silvestre (**Figura 29**). De este modo, la diferencia en la capacidad simbiótica de los mutantes en *rkpU* y *rkpM* con *L. burttii* podrían ser debidas a la alteración estructural específica que muestra este último mutante. Además, la mutación en *rkpM* parece ser más perjudicial para la capacidad simbiótica con soja que con *L. burttii*, ya que sólo en esta última es capaz de inducir nódulos fijadores de nitrógeno. Ninguno de los mutantes pertenecientes a la región *rkp-1* (*rkpA* y *rkpU*) o *rkp-3* (*rkpM* y otros mutantes afectados en *rkpL* y *rkpQ*) ha sido capaz de ganar la nodulación con *L. japonicus* Gifu, lo que indica que la presencia de KPS podría no ser la responsable de la ausencia de nódulos fijadores en *L. japonicus* inoculados con *S. fredii* HH103.

El KPS puede reemplazar al EPS en la interacción de *S. meliloti* con *M. sativa* (Pellock *et al.*, 2000). Debido a esta equivalencia, los mutantes en *S. meliloti* que producen sólo EPS o sólo KPS son simbióticamente efectivos. En la simbiosis de *S. fredii* HH103 con soja, el mutante *rkpA* (EPS⁺KPS⁻) está perjudicado, mientras que el mutante en *exoA* (EPS⁻KPS⁺) no se afecta negativamente (Parada *et al.*, 2016). El mutante en *rkpH-exoA*, incapaz de producir tanto KPS como EPS, es capaz de formar nódulos fijadores de nitrógeno con *L. burttii* y no con *L. japonicus* Gifu. Por tanto, de estos resultados puede concluirse que la ausencia simultánea de la producción de EPS y KPS ni abole la nodulación con *L. burttii* ni mejora la nodulación con *L. japonicus*.

Las mutaciones que afectan al LPS normalmente provocan impactos severos sobre la simbiosis que forman nódulos determinados, como las constituidas por *S. fredii*-soja (Margaret *et al.*, 2013), *Bradyrhizobium* spp.-soja (Stacey *et al.*, 1991), o *R. etli*-*Phaseolus vulgaris* (Noel *et al.*, 1986). Aunque el perfil electroforético de los mutantes de *S. fredii* en los genes *lpsB* y *lpsE* está claramente alterado debido a las mutaciones en los genes involucrados en la síntesis de LPS (**Figura 29**) (Margaret *et al.*, 2013), solamente se detectó una deficiencia moderada en su interacción con *L. burttii* (**Tabla 11**). El impacto negativo causado por la mutación en *lpsB* sobre la capacidad simbiótica de *S. fredii* HH103 es mucho fuerte en soja que en *L. burttii*. Igualmente, el mutante *lpsL* está más afectado en simbiosis con soja que con *L. burttii* y lo mismo ocurre con los mutantes de

la región *rkp-3*. Todos estos datos sugieren que el requerimiento de una estructura de LPS intacta podría ser más importante en interacciones con soja y *P. vulgaris* que con *Lotus* sp. La ausencia de una deficiencia simbiótica severa asociada a mutaciones en el LPS está en consonancia con los resultados anteriores que muestran que un mutante totalmente carente del antígeno-O en *M. loti* es capaz de inducir nódulos fijadores de nitrógeno en *L. tenuis* (D'Antuono *et al.*, 2005). Se deberían llevar a cabo estudios más en profundidad para aclarar esta cuestión.

Las plantas de *L. burttii* inoculados con el mutante en *ndvB* sólo formaron nódulos inefectivos, que es el mismo fenotipo simbiótico observado anteriormente con soja (Crespo-Rivas *et al.*, 2009). Este resultado está en la línea de anteriores datos aportados por diversos mutantes de rizobios incapaces de producir GC (Breedveld y Miller, 1998): todos los mutantes en *ndvB* (de *S. meliloti*, *S. fredii*, *M. loti* o *B. japonicum*), los cuales no son capaces de inducir nódulos fijadores de nitrógeno en sus respectivas leguminosas hospedadoras (Crespo-Rivas *et al.*, 2009; D'Antuono *et al.*, 2005; Dylan *et al.*, 1986).

El fracaso de la interacción simbiótica entre *S. fredii* HH103 y *L. japonicus* puede deberse a la presencia de señales inadecuadas o, simplemente, a la falta de señales adecuadas. Ninguno de los mutantes afectados en polisacáridos superficiales de *S. fredii* HH103 investigados ha sido capaz de ganar la capacidad de nodular con *L. japonicus*, lo que indica que ninguno de estos polisacáridos es el único responsable de esta incompatibilidad simbiótica. Este hecho no excluye la posibilidad de que alguno de los polisacáridos de HH103 pudiera actuar como señal incompatible para *L. japonicus*, debido a que pudiera darse el caso de que más de uno de ellos esté bloqueando el proceso de nodulación. El doble mutante EPS⁻KPS⁻ de HH103 no gana la capacidad de nodular con *L. japonicus*, lo que revela que estos dos polisacáridos superficiales no están cooperando para bloquear la nodulación en esta planta. La pérdida de producción de GC da lugar a la pérdida de la nodulación efectiva con *L. burttii* y no provoca ninguna mejora simbiótica con *L. japonicus*. Por lo tanto, si dos polisacáridos superficiales de HH103 fueran los responsables de la incapacidad de nodular *L. japonicus*, el LPS podría ser uno de los candidatos.

Hasta ahora, se han descrito tres modos de entrada de los rizobios en diferentes leguminosas investigadas: infección simple intracelular, *crack entry* e invasión por TI

(Sprent, 2007). La primera de ellas sería la vía más primitiva por la cual los rizobios invaden las raíces de las leguminosas, seguida del *crack entry* y, por último, la infección por pelo radical (Madsen *et al.*, 2010). Nuestros estudios de microscopía confocal, junto con la incapacidad del mutante *nodA* de *S. fredii* HH103 para nodular *L. burtii*, demuestran que la vía por la que *S. fredii* HH103 invade *L. burtii* puede ser clasificada como evolutivamente intermedia, concretamente *crack entry* dependiente de NF. Al menos en la simbiosis de *L. burtii*-*S. fredii* HH103, este modo de infección no requiere estrictamente la producción de polisacáridos superficiales liberados por la bacteria (como el EPS) o unido a la cara externa de la membrana externa (como el KPS). Tampoco se requiere la forma silvestre del LPS, ya que ninguna de las alteraciones del LPS mostradas por los mutantes en *lpsB*, *lpsE*, *rkpU* y *rkpM* han abolido totalmente la formación de nódulos en *L. burtii* (**Tabla 11**). El mutante en *ndvB* ha sido el único mutante en polisacáridos superficiales de los investigados que ha sido incapaz de inducir nódulos fijadores de nitrógeno en *L. burtii*. Por lo tanto, los GC no son sólo necesarios para la invasión por TI, como en las simbiosis de *S. fredii* HH103-soja o *S. meliloti*-alfalfa, sino que también son requeridos para la infección mediante *crack entry*, menos evolucionada, presente en la interacción *S. fredii* HH103-*L. burtii*.

Las raíces de *L. burtii* se infectan por *M. loti* a través de TI en los pelos radicales, mientras que *S. fredii* HH103 invade esta leguminosa a través de roturas epidérmicas (**Figura 32**). Del mismo modo, *L. japonicus* Nepal puede cambiar el modo de infección de una forma intracelular como ocurre con *R. leguminosarum* Norway a infección por TI con *M. loti* (Gossmann *et al.*, 2012). Todos estos resultados, indican que las raíces de una leguminosa en particular pueden ser infectadas por diferentes vías en función de la pareja rizobiana.

Capítulo III. Regulación de la producción de EPS por flavonoides*

1. Introducción

El EPS tiene un papel importante tanto en células de vida libre como en simbiosis, sobre todo en las etapas tempranas de ésta (Frayse *et al.*, 2003; Skorupska *et al.*, 2006). Este polisacárido proporciona protección frente a diferentes estreses como desecación y determinados compuestos antimicrobianos, participa en la unión de la bacteria a superficies y es un importante elemento estructural de las biopelículas (*biofilms*) bacterianas (Frayse *et al.*, 2003; Janczarek, 2011). La estructura del EPS es variable entre los rizobios, aunque es común la presencia de ciertos monosacáridos (López-Baena *et al.*, 2016). En función del tipo de planta con el cual la bacteria interacciona, el papel del EPS puede ser más o menos importante. Tradicionalmente se ha aceptado que el EPS juega un papel esencial en las interacciones con plantas que forman nódulos de tipo indeterminado, como ocurre en las simbiosis *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago* o *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*-*Trifolium* (Janczarek, 2011). Sin embargo, no es este siempre el caso, como ocurre con *S. fredii* HH103 en sus interacciones con *Glycyrrhiza uralensis* o *Cajanus cajan* (Margaret-Oliver *et al.*, 2012; Parada *et al.*, 2006), en las que un mutante afectado en el gen *exoA*, y por tanto incapaz de producir EPS, sigue induciendo la formación de nódulos fijadores de nitrógeno.

En algunos rizobios, los flavonoides inductores de los genes *nod* son capaces de afectar a la producción de ciertos polisacáridos. Este es el caso de *S. fredii* NGR234, en el que la presencia de apigenina reduce la cantidad de KPS producido y, además, induce la aparición de un nuevo LPS rico en ramnosa. Estos cambios son producidos de una forma dependiente de flavonoides y del regulador transcripcional NodD (Simsek *et al.*, 2009; Ardissonne *et al.*, 2011). En *S. fredii* USDA193, la presencia de genisteína da lugar a cambios en la masa molecular del EPS (Dunn *et al.*, 1992). En el caso de *S. fredii* HH103, al contrario de lo que ocurre en con NGR234, la presencia de flavonoides inductores como la genisteína no afecta la producción del KPS o del LPS, pero, en cambio, da lugar a un fenotipo no mucoso (Hidalgo *et al.*, 2010; Vinardell *et al.*, 2015). Dicho fenotipo también tiene lugar cuando se inactiva el gen regulador *nolR* (Vinardell *et al.*, 2004a).

Con estos antecedentes en nuestro grupo, se decidió investigar la relación entre los flavonoides inductores de los genes *nod* y la producción del EPS en *S. fredii* HH103.

* Los resultados expuestos en este capítulo han sido publicados en la revista PLOS ONE:

Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., Murdoch, P. del S., Crespo-Rivas, J.C., Jie, S., Cuesta-Berrio, L., Ruiz-Sainz, J.E., Rodríguez-Carvajal, M.Á., Vinardell, J.M. 2016. Exopolysaccharide production by *Sinorhizobium fredii* HH103 is repressed by genistein in a NodD1-dependent manner. PLoS One. 11:e0160499.

2. Resultados

2.1. La producción de EPS en *S. fredii* HH103 está regulada por flavonoides inductores de genes *nod*.

Resultados anteriores de nuestro grupo de investigación habían demostrado que la mucosidad de *S. fredii* HH103 en medio YM se regula negativamente por la presencia de genisteína, un flavonoide presente en exudados de soja y que es un inductor de los genes *nod* en esta estirpe (Vinardell *et al.*, 2004b). Estos resultados nos llevaron a investigar si este efecto también se da en otras estirpes de *S. fredii*, USDA257 y NGR234, las cuales, junto con HH103, son las estirpes de esta especie mejor estudiadas hasta la fecha (Vinardell *et al.*, 2015; López-Baena *et al.*, 2016). Como controles negativos del efecto de la genisteína se usaron flavona (un flavonoide no inductor de los genes *nod*) (Vinardell *et al.*, 2004b) y etanol (el solvente usado para disolver los flavonoides). Además de las estirpes de *S. fredii*, en nuestros estudios también se incluyó la estirpe Rm1021 de *S. meliloti* ya que se había descrito que los flavonoides tienen un ligero efecto inductor sobre su producción de EPS I (Dusha *et al.*, 1999). Por ello, además del de la genisteína, también se estudió el efecto de la luteolina, un flavonoide presente en los exudados de *Medicago sativa* que es un inductor efectivo de los genes *nod* tanto en *S. meliloti* como en *S. fredii* (Vinardell *et al.*, 2004b; Peters *et al.*, 1986).

Los resultados presentados en la **figura 35** indican que, entre las diferentes estirpes de *S. fredii* probadas, el efecto de los flavonoides sobre la producción de EPS parece ser específico de HH103. En las placas de YMA suplementadas con genisteína o luteolina, *S. fredii* HH103 muestra un aspecto rugoso, mientras que las estirpes USDA257 y NGR234 aparentemente no se afectaron por la presencia de estos flavonoides. En este experimento, no se apreció ningún efecto de la presencia de luteolina sobre la producción de EPS I en Rm1021. La apariencia de *S. fredii* HH103 no se alteró en placas de YMA suplementadas con etanol o flavona, indicando que ni el solvente orgánico usado para disolver los flavonoides ni los flavonoides no inductores de los genes *nod* afectan a la mucosidad de esta estirpe.

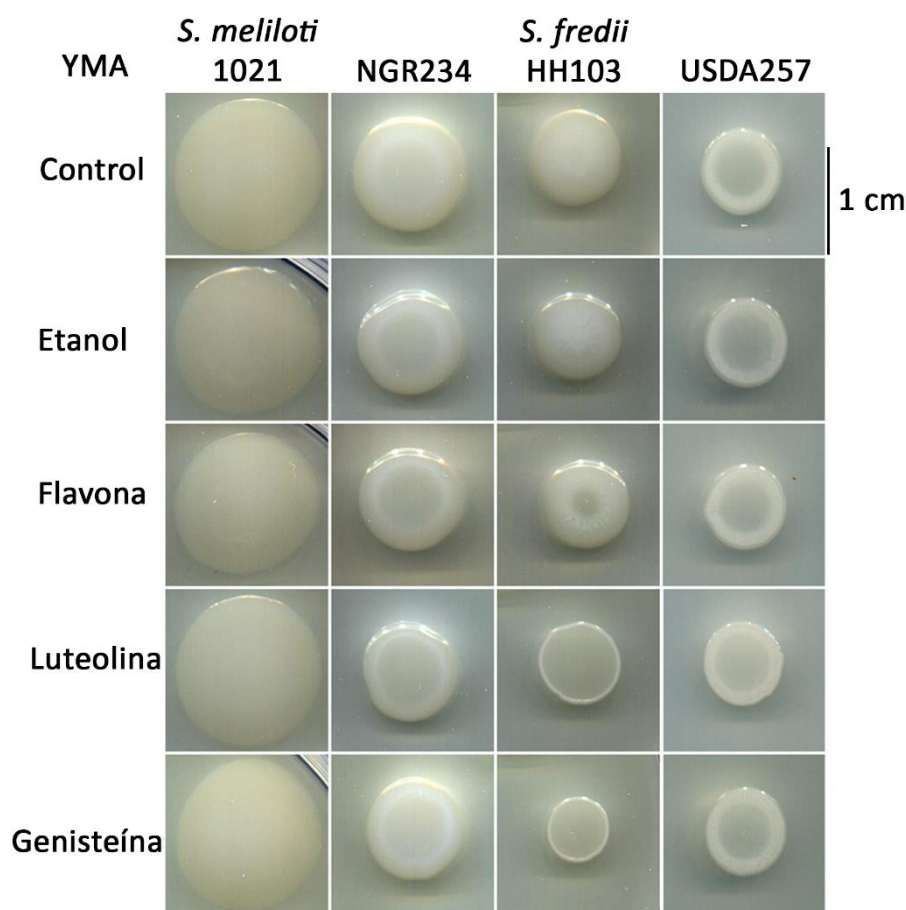


Figura 35. Mucosidad de diferentes estirpes de *Sinorhizobium* en medio YMA en presencia o ausencia de flavonoides. Los compuestos usados para suplementar el medio YMA están indicados en la izquierda. Fuente, Acosta Jurado *et al.* (2016b).

2.2. La regulación del EPS de *S. fredii* HH103 mediada por flavonoides depende del regulador *nodD1*.

Ya que sólo aquellos flavonoides que son inductores de los genes *nod* tienen un efecto negativo sobre la producción de EPS en *S. fredii* HH103, decidimos investigar si existe alguna conexión entre el regulón *nod* y la producción de EPS en esta bacteria. Para este propósito, analizamos el efecto de la genisteína sobre la mucosidad tanto de la estirpe silvestre como de mutantes de HH103 afectados en el gen *nodA* (incapaz de producir NF) y en diversos genes reguladores de los genes *nod* presentes en esta estirpe (Machado *et al.*, 1998; Vinardell *et al.*, 2004a, b; 2015): *nodD1*, *nodD2*, y *nolR* (**Figura 36**). Como control negativo se empleó la estirpe SVQ530, un derivado de HH103 mutado en el gen *exoA* y, por tanto, incapaz de producir EPS (Parada *et al.*, 2006; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014).

Tal y como se esperaba, tanto en presencia como en ausencia de flavonoides, HH103 *exoA* mostró un aspecto rugoso. La presencia de genisteína, pero no de flavona, dio lugar a una disminución de la mucosidad en la estirpe parental y en los mutantes en los genes *nodD2* y *nodA*. Sorprendentemente, en ausencia de flavonoides o en presencia de flavona, se observó que el aspecto del mutante *nodA* fue diferente del silvestre debido a que poseía disrupciones o pequeños orificios en la mucosidad formada. Como se había descrito anteriormente (Vinardell *et al.*, 2004b), la ausencia de NodR genera una pérdida del fenotipo mucoso de *S. fredii* HH103, incluso en ausencia de flavonoides, aunque este fenotipo era más evidente en presencia de genisteína. En cambio, la presencia de genisteína no afectó a la mucosidad del mutante *nodD1*. La introducción de una copia silvestre de *nodD1* (portado en el plásmido pMUS296) reestableció el efecto negativo de la genisteína en el mutante *nodD1* e incluso se redujo la mucosidad del silvestre y del mutante *nodD1* en ausencia de genisteína cuando portaban este plásmido. Estos resultados indican que la represión de la mucosidad de HH103 mediada por genisteína, requiere la participación de NodD1. Sin embargo, la introducción de copias extras de *nodD2* (presenta en el plásmido pMUS756) también reduce la mucosidad en el silvestre en ausencia de genisteína, sugiriendo que, cuando se sobre-expresa, NodD2 podría mimetizar la represión de la mucosidad ejercida por NodD1.

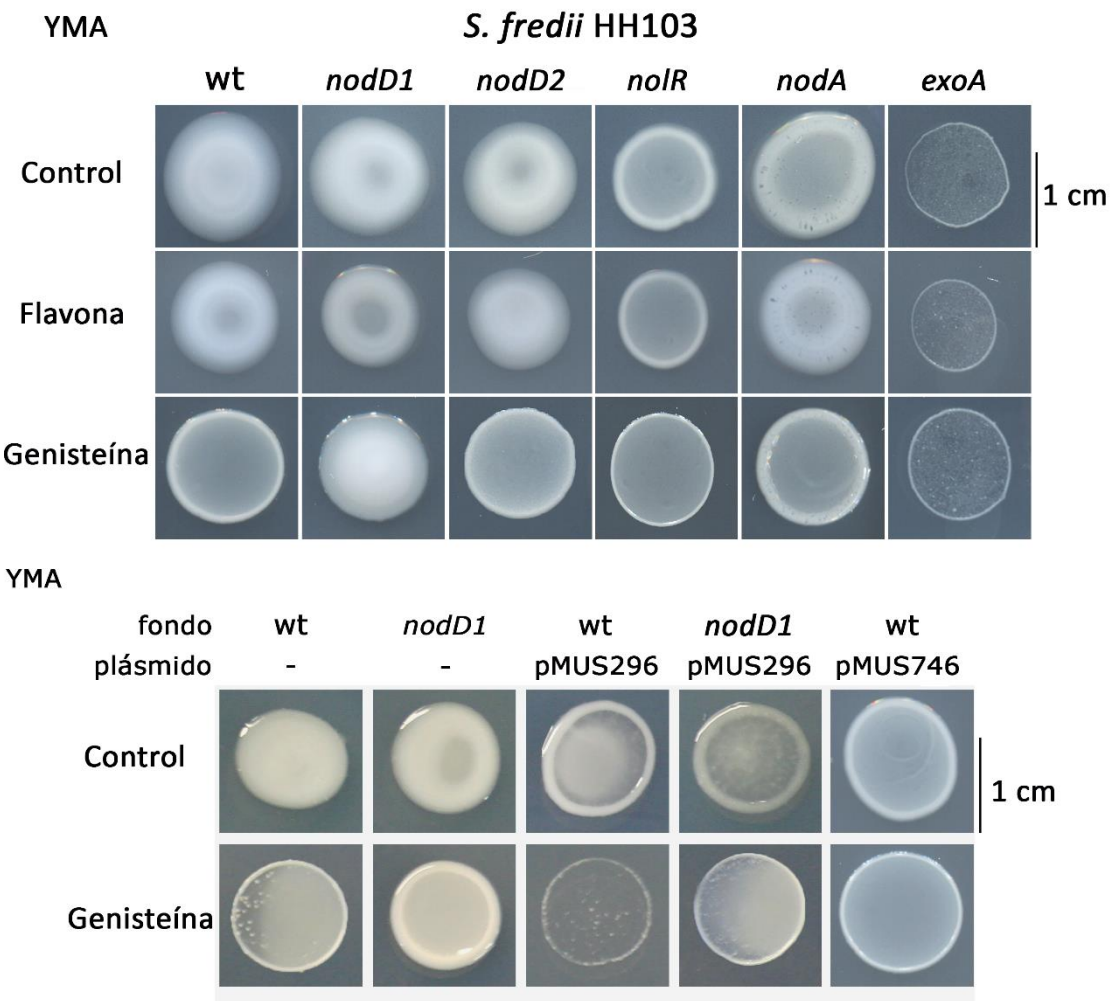


Figura 36. Mucosidad de *S. fredii* HH103 y diferentes mutantes en YMA en ausencia o presencia de flavona o genisteína. El gen afectado por la mutación en cada estirpe está indicado en la zona superior de cada columna. Los plásmidos pMUS296 y pMUS746 portan las copias silvestres de *nodD1* y *nodD2* de HH103 respectivamente. Los compuestos usados para suplementar el medio YMA están indicados en la zona izquierda. El control indica la ausencia de flavonoides. Fuente, Acosta Jurado *et al.* (2016b).

La producción de EPS en ausencia o presencia de genisteína en *S. fredii* HH103 y los mutantes *nodA*, *nodD1*, y *nolR* se investigó además mediante la cuantificación de la cantidad de equivalentes de glucosa presentes en el medio extracelular de cultivos de estas estirpes en YM (**Figura 37**, panel A). El mutante en el gen *exoA* se usó como control negativo de producción de EPS. Los bajos niveles de equivalentes de glucosa detectados en el mutante *exoA* podrían corresponder a otros polisacáridos presentes en el sobrenadante de los cultivos como los GC. La presencia de genisteína redujo alrededor de 10 veces la cantidad de equivalentes de glucosa producidos por HH103 (hasta niveles similares a los del mutante *exoA*) mientras que en el mutante *nodD1* este parámetro no

se afectó. Además, el mutante *noIR* produjo claramente menos cantidad de equivalentes de glucosa que la estirpe silvestre, independientemente de la presencia o ausencia de genisteína. En ausencia de flavonoides, el derivado *nodA* produjo cantidades similares en comparación con la estirpe silvestre. Sorprendentemente, cuando esta estirpe se cultivó en presencia de genisteína, la cantidad de equivalentes de glucosa presentes en el medio extracelular aumentó notable y significativamente en comparación con los cultivos del silvestre y del mutante *nodA* en ausencia de inductor. En estos momentos, desconocemos tanto las razones como el significado de este aumento, que nuestro grupo pretende estudiar con mayor profundidad en un futuro cercano.

Nuestro grupo ha mostrado recientemente que el EPS de *S. fredii* HH103 juega un papel esencial en la capacidad formadora de *biofilms* sobre superficies plásticas (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014). Debido a ello, se investigó si esta capacidad bacteriana también se afecta por la presencia de genisteína. Al igual que en experimentos anteriores, el mutante *exoA* se empleó como control negativo de formación de *biofilms*. Como se muestra en el panel B de la **figura 37**, la presencia de genisteína reduce drásticamente la cantidad de *biofilm* formado en el caso de la estirpe silvestre pero no en el del mutante en el gen *nodD1*. El mutante *noIR* formó menos cantidad de *biofilm* que la cepa silvestre en ausencia de flavonoides, y también se afectó negativamente por la presencia de genisteína. Sin embargo, la disminución en la formación de *biofilm* dada en este mutante no fue tan drástica como la reducción de la producción de EPS. Estos resultados podrían ser debidos al hecho de que *NoIR* es un regulador global, por lo que su ausencia podría afectar otros aspectos involucrados en la adhesión bacteriana. La capacidad formadora de *biofilm* del mutante *nodA* fue similar a la de la cepa silvestre, tanto en ausencia como en presencia de genisteína.

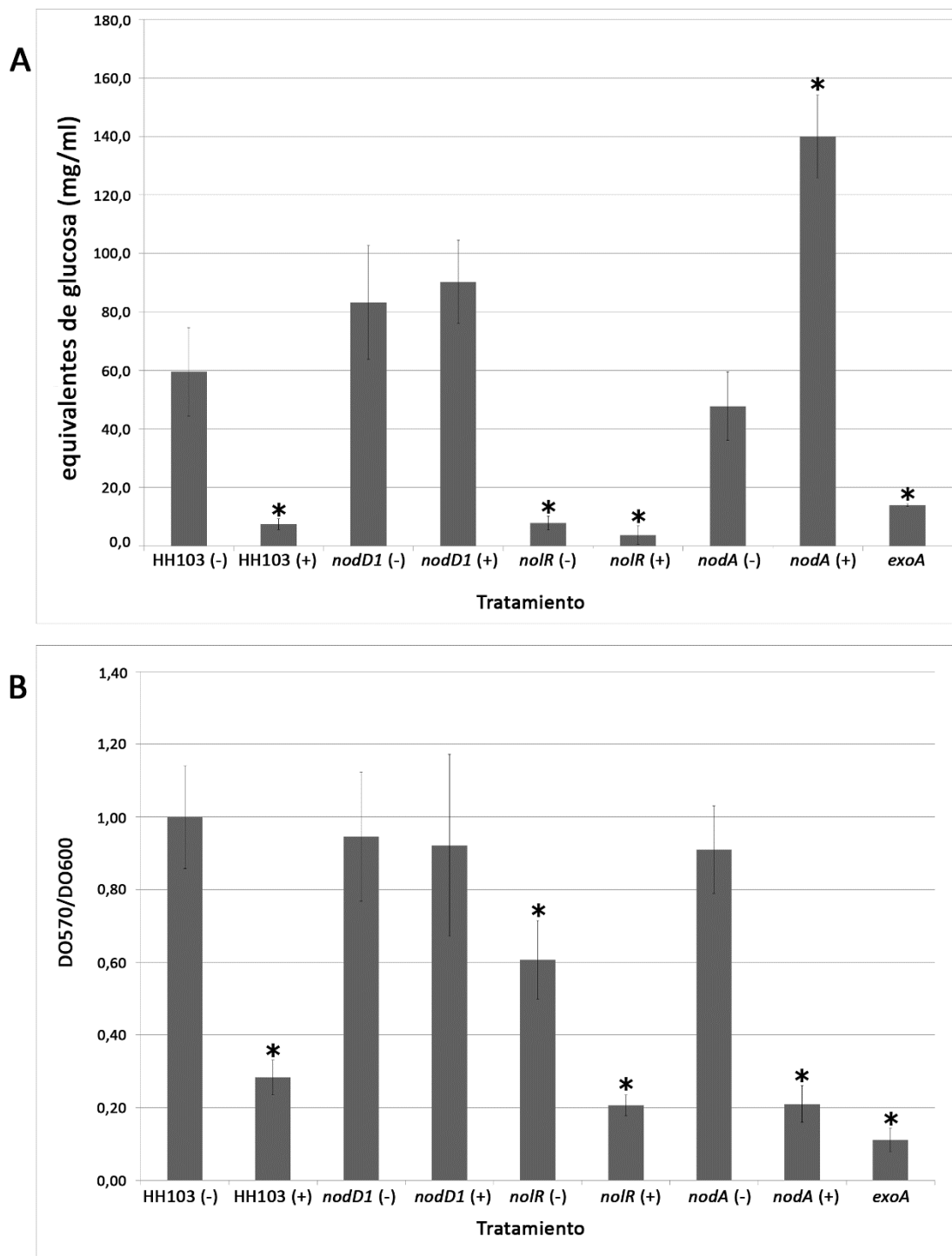


Figura 37. Equivalentes de glucosa en el medio extracelular (A) y capacidad de formación de *biofilm* (B) de *S. fredii* HH103 y los mutantes *nodA*, *nodD1*, *nolR* y *exoA* crecidos en presencia (+) o ausencia (-) de genisteína. La presencia de un asterisco indica una diferencia significativa ($p = 0,01$) con respecto a la estirpe silvestre crecida en ausencia de flavonoides (-). Fuente, Acosta Jurado *et al.* (2016b).

2.3. Los experimentos de H-RMN confirman que la genisteína disminuye la producción de EPS de *S. fredii* de forma dependiente de NodD1.

Los experimentos descritos en los puntos anteriores de este capítulo habían mostrado que los flavonoides inductores en conjunción con la proteína NodD1 tienen un efecto represor sobre la mucosidad de *S. fredii* HH103, mientras que el regulador NodR tiene un efecto positivo sobre esta característica. Con objeto de averiguar si estas alteraciones en la mucosidad se debían a variaciones en el EPS y, en caso positivo, si eran cuantitativas y/o cualitativas, se procedió a purificar el EPS producido por la estirpe silvestre y sus mutantes en los genes *nodD1* y *nolR*, crecidos en presencia y ausencia de genisteína, y a realizar estudios estructurales mediante resonancia magnética nuclear en colaboración con el grupo del Dr. Rodríguez-Carvajal del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla.

La **figura 38** muestra que cuando HH103 se creció en ausencia de genisteína (HH103-), los aislados de los sobrenadantes contenían principalmente EPS (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014) junto a componentes minoritarios como mananas, provenientes del extracto de levadura (componente del medio YM), o pequeñas cantidades de KPS (Gil-Serrano *et al.*, 1999). En el caso del mutante *nodD1*, los espectros obtenidos tanto en presencia como en ausencia de genisteína (*nodD1*- y *nodD1*+, respectivamente) fueron similares al de HH103 crecido en ausencia de flavonoides. Por el contrario, los espectros de las muestras de HH103 (HH103+) y del mutante *nolR* (*nolR*+) crecidos en presencia de genisteína, no mostraron señales de EPS, mientras que en el espectro correspondiente al cultivo no inducido del mutante *nolR* (*nolR*-), estas señales eran muy débiles. En estos tres casos, los espectros de H-RMN presentaron principalmente señales provenientes de las mananas y KPS, indicando que la cantidad de EPS se redujo drásticamente o totalmente.

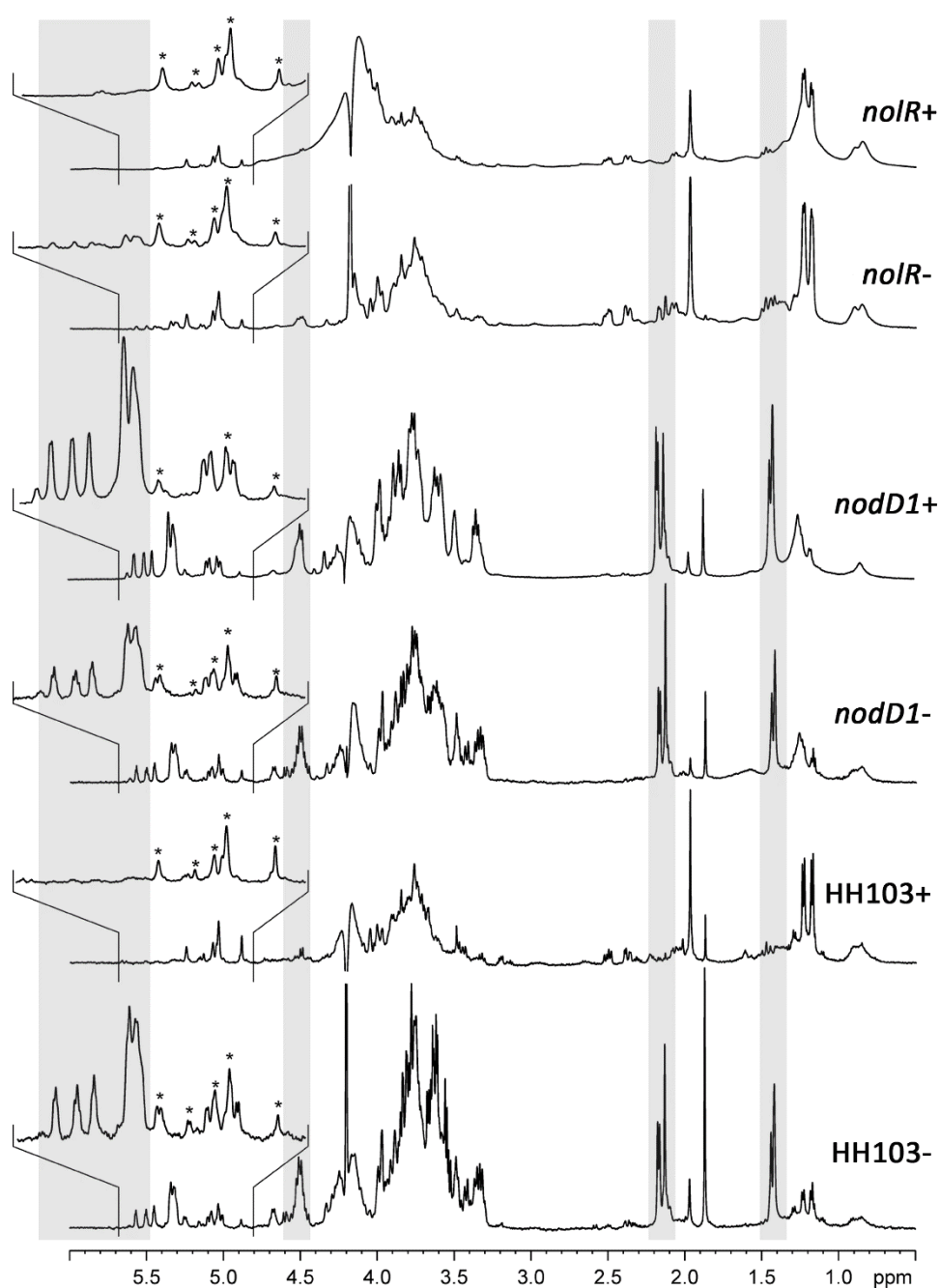


Figura 38. H-RMN (500.20 MHz, 353 K) de los polisacáridos aislados de los sobrenadantes de cultivos de YM de *S. fredii* HH103 y sus mutantes *nodD1* y *nolR* crecidos en ausencia (-) o presencia de genisteína (+). Las señales correspondientes al EPS están sombreadas en gris. Los picos marcados con asteriscos corresponden a las mananas presentes en el extracto de levadura, uno de los componentes del medio YM. Fuente, Acosta Jurado *et al.* (2016b).

De este modo, los análisis de H-RMN mostraron que la genisteína reduce la producción de EPS en *S. fredii* HH03 sólo cuando está presente una copia funcional del gen *nodD1*, y que la ausencia de *NolR* también provoca una disminución de la cantidad de EPS producida. En conjunto, nuestros resultados indican que la producción de EPS en HH103

se regula de forma opuesta a los NF y a las Nops: se reprime por NodD1 y flavonoides, los cuales se requieren para la expresión de los genes involucrados en la producción de los NF y las Nops, pero aumenta en presencia de la proteína reguladora NodR, que a su vez reprime la expresión de los genes *nod* y *nop* (Vinardell *et al.*, 2004a).

2.4. La genisteína promueve una reducción de la expresión de *exoK* y *exoY2* en cultivos de fase estacionaria de *S. fredii* HH103

La represión de la producción del EPS mediada por genisteína en *S. fredii* HH103 nos llevó a investigar si la presencia de este flavonoide podía tener un efecto sobre la expresión de genes relacionados con la producción de EPS en esta estirpe. Muy recientemente, nuestro grupo ha realizado un análisis transcriptómico del efecto de la genisteína sobre la expresión génica global en *S. fredii* HH103 [datos disponibles en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA313151>; Pérez-Montaña *et al.*, 2016]. Estos estudios, que se llevaron a cabo con muestras de ARN extraídas tras 24 horas de crecimiento en presencia de genisteína (fase estacionaria temprana), no revelaron cambios significativos (*fold changes* $\leq 1,6$) en los niveles de expresión de los genes directamente involucrados en la producción de EPS, *exo* y *exs* (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014; Vinardell *et al.*, 2015).

Ya que la producción de EPS en *S. fredii* HH103 sólo es evidente en fase estacionaria tardía, se decidió investigar el nivel de expresión de varios genes *exo* a las 96 horas de tratamiento con genisteína. Los genes *exo* y *exs* de *S. fredii* HH103 se disponen agrupados en una región del plásmido de mayor tamaño de esta estirpe (psfHH103e) (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014; Vinardell *et al.*, 2015). Para nuestros estudios, seleccionamos los genes *exoA*, *exoY2* y *exoK*. Aunque los estudios bioquímicos de las actividades enzimáticas de los productos codificados por estos genes no se han llevado a cabo en *S. fredii* HH103, su alto nivel de identidad con las proteínas correspondientes de *S. meliloti* (cuyas actividades están claramente establecidas, revisado por Janczarek (2011)) sugiere que muy probablemente tienen el mismo papel que éstas. De este modo, ExoA podría estar involucrado en la adición del primer residuo de glucosa a la estructura formada por la galactosa unida al lípido transportador de la subunidad de repetición del EPS naciente; ExoY podría participar en la adición del primer azúcar al

lípidos transportador, y ExoK podría actuar como una glicanasa involucrada en la rotura del EPS de alto peso molecular para generar el EPS de bajo peso molecular.

Para el análisis de la expresión de los genes *exo*, se realizaron experimentos de *qPCR* usando ADNc de cultivos en fase estacionaria temprana (24 horas) o tardía (96 horas) de *S. fredii* HH103 y de los derivados *nodD1* y *noIR* crecidos en presencia o ausencia de genisteína (**Figura 39**). Además de *exoA*, *exoK*, y *exoY2*, también se estudió el gen *nodA* como gen control que se induce mediante NodD1 y flavonoides y se reprime por NoIR. Como se esperaba, la expresión de *nodA* se indujo fuertemente por la genisteína cuando está presente la proteína NodD1 funcional (silvestre), potenciándose este efecto en ausencia de NoIR (fondo del mutante *noIR*). Esta inducción se observó tanto a las 24 como a las 96 horas de cultivo. Después de 24 horas de crecimiento, los niveles de expresión de *exoA*, *exoK* y *exoY2* en los fondos de los mutantes *nodD1* y *noIR* no fueron diferentes de la expresión de los mismos en el silvestre tanto en ausencia como en presencia de genisteína, en consonancia con los resultados obtenidos mediante RNAseq (Pérez-Montaña *et al.*, 2016). En los cultivos de 96 horas, la expresión de *exoA* no se afectó en presencia de flavonoide en ninguna de las tres estirpes analizadas. Por el contrario, *exoK* y *exoY2* mostraron una reducción de la expresión cuando están presentes tanto la genisteína como NodD1 (cultivos inducidos del silvestre y la estirpe mutante en *noIR*). Este efecto fue más acusado en el caso de *exoY2*, cuyo nivel de expresión se redujo 5 y 10 veces en HH103 y en el mutante *noIR*, respectivamente. En el caso del mutante *noIR*, esta reducción en los niveles de expresión de *exoY2* se dio tanto en presencia como ausencia de genisteína

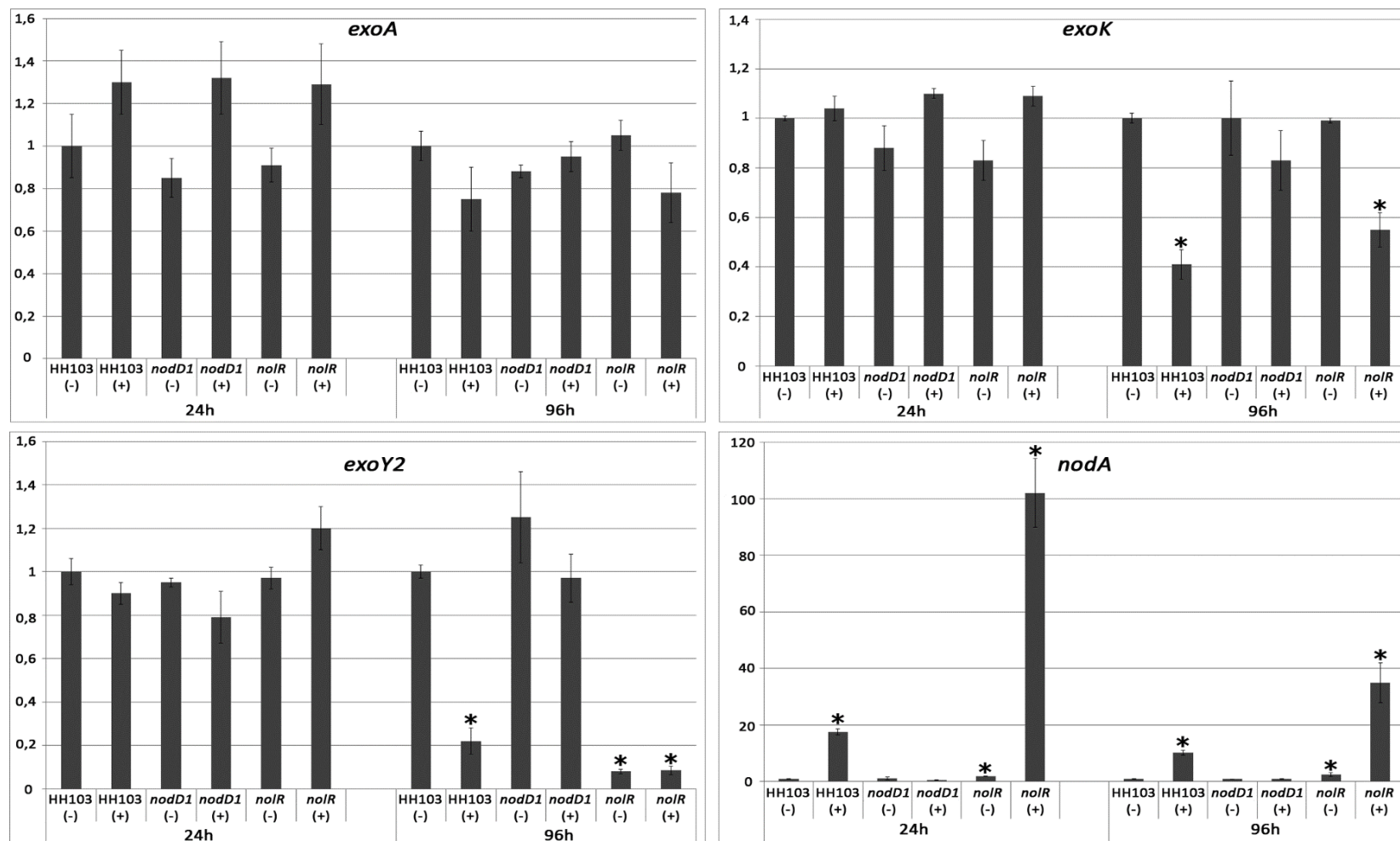


Figura 39. Análisis de qRT-PCR del efecto de la genisteína en la expresión de los niveles de *exoA*, *exoK* y *exoY2* en *S. fredii* HH103 y sus mutantes *nodD1* y *nolR* en cultivos de fase estacionaria temprana (24h) y tardía (96h). (-) y (+) indican la ausencia y presencia de genisteína respectivamente. La presencia de un asterisco indica una diferencia significativa al 1% con respecto al nivel de expresión de la estirpe silvestre crecida en ausencia de genisteína. Fuente, Acosta Jurado *et al.* (2016b).

3. Discusión

La simbiosis fijadora de nitrógeno entre los rizobios y las leguminosas está basada en un intercambio de señales entre ambos simbioses (Downie, 2010; Janczarek *et al.*, 2015; López-Baena *et al.*, 2016). Está bien establecido que los flavonoides exudados por las raíces de las leguminosas interactúan con la proteína bacteriana NodD induciendo la expresión de los genes *nod*, los cuales son responsables de la producción y secreción de los NF. Estas señales moleculares, por otro lado, provocan la curvatura del pelo radical y la formación de los primordios nodulares y también se requieren para la formación de los tubos de infección. En algunos rizobios, incluyendo estirpes de *S. fredii*, se requieren tanto los flavonoides como NodD para inducir la expresión de *ttsI*, el cual codifica el activador transcripcional del sistema de secreción de tipo III responsable de la liberación de las proteínas efectoras bacterianas dentro de las células de la planta hospedadora (revisado en Staehelin y Krishnan, 2015).

En *S. fredii* NGR234, los flavonoides también influyen en la producción de polisacáridos superficiales. La presencia de apigenina (un inductor efectivo de los genes *nod* en esta estirpe) reduce la cantidad del KPS producido en un proceso mediado por *nodD1* y *y4gM* (Simsek *et al.*, 2009) y permite la producción de un LPS rico en ramnosa a través de la inducción de los genes *fixF*, *rgpF* y *wbgA* (Ardissone *et al.*, 2011). En *S. fredii* HH103 no se da ninguno de estos cambios, ya que *y4gM*, *fixF*, *rgpF* y *wbgA* no están presentes en esta estirpe (Vinardell *et al.*, 2015).

En este trabajo hemos mostrado que un flavonoide inductor de los genes *nod*, la genisteína, reduce la producción del EPS de HH103 de forma dependiente de NodD1. Esta es la primera vez que este mecanismo de represión se describe en rizobios. En trabajos anteriores se ha comprobado que en *S. fredii* USDA193 la genisteína provoca cambios en la producción de EPS (Dunn *et al.*, 1992), pero estos cambios son estructurales (menor masa molecular media y reducción del contenido de los ácidos urónicos comparados con el control) y, aunque es un proceso dependiente del plásmido simbiótico, no se ha estudiado si está mediado por la proteína NodD. En *S. fredii* USDA191 la presencia de copias extra de *nodD2* da lugar a una morfología rugosa de la colonia mientras que copias extra de *nodD1* sólo provoca una ligera reducción del EPS en esta estirpe (Appelbaum *et al.*, 1988; Machado y Krishnan, 2003). Además, estos

cambios no dependen de la presencia de flavonoides. En *S. fredii* HH103, la ausencia de *nodD1*, pero no de *nodD2*, permite el desarrollo de un fenotipo mucoso en presencia de flavonoides, indicando que el efecto represor de los flavonoides en esta estirpe está mediado por NodD1. Sin embargo, la presencia del plásmido pMUS746 en la estirpe silvestre también reduce esta mucosidad en presencia de flavonoides, indicando que, cuando se sobre-expresa, NodD2 también es capaz de reprimir la producción de EPS en HH103. La reciente secuenciación del genoma de *S. fredii* HH103 y los estudios transcriptómicos realizados han permitido detectar la presencia de 15 *nod boxes* funcionales (Vinardell *et al.*, 2015; Pérez-Montaña *et al.*, 2016), pero ninguna de ellas está localizada aguas arriba de los genes que están directamente involucrados en la biosíntesis del EPS (genes *exo* y *exs*). Por lo tanto, el efecto de NodD1 y la genisteína sobre la producción de EPS en *S. fredii* HH103 probablemente está mediada por otras proteínas reguladoras, las cuales aún no se han identificado.

En contraste con los resultados presentados en este capítulo, tanto en *S. meliloti* Rm1021 como en *R. leguminosarum* bv. *Trifolii* 24.2 se ha demostrado que la presencia de flavonoides potencia la producción de EPS (Dusha *et al.*, 1999; Janczarek y Skorupska, 2011). En Rm1021 este efecto está mediado por el regulador transcripcional SyrM el cual está conectado con el regulón *nod* a través de NodD3 y estimula la producción de EPS a través de SyrA (Barnett *et al.*, 1998; Barnett y Long, 2015). En las estirpes de *S. fredii*, *syrM* está presente, pero no *nodD3* ni *syrA* (Vinardell *et al.*, 2015; Weidner *et al.*, 2012). *R. leguminosarum* bv. *trifolii* carece de *syrM* y en la estirpe 24.2 el efecto de los flavonoides que se encuentran en los exudados de las raíces de trébol sobre la producción del EPS se ejerce a través del regulador transcripcional RosR (Janczarek y Skorupska, 2011). En *S. fredii* HH103, la transcripción de *syrM* depende de la NB19 y se activa por NodD1 y genisteína (Vinardell *et al.*, 2015), por lo que hace que este gen sea un buen candidato para la regulación del EPS. Otro de los genes de HH103 que podría estar involucrado en la regulación del EPS es pSfHH103d_161 (Vinardell *et al.*, 2015) cuya expresión está dirigida por la NB10. Este gen codifica una proteína hipotética que comparte una identidad del 58% con PsiB de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, un represor de EPS que no ha sido estudiado en otros rizobios (Mimmack *et al.*, 1994). Los resultados obtenidos por nuestro grupo demuestran que el efecto de los flavonoides sobre la

producción de EPS en *S. fredii* HH103 se da a través del regulón *nod* e involucra a NodD1 y NodR como un represor y un activador de la producción del EPS respectivamente. De este modo, en *S. fredii* HH103 la producción de EPS se regula de manera opuesta a la de los NF y a la secreción de efectores a través T3SS, procesos que se inducen por NodD1 y flavonoides y se reprimen por NodR (Vinardell *et al.*, 2004a, b; López-Baena *et al.*, 2008). Independientemente de que otros genes puedan participar en esta red reguladora, la presencia de genisteína y/o la ausencia de NodR dan lugar a una disminución significativa de la expresión de los genes *exoK* y *exoY2* en la fase estacionaria tardía, como se ha demostrado por *qPCR*. Estos resultados están en consonancia con las observaciones previas llevadas a cabo en *S. meliloti* y *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, en los cuales la producción de EPS se logra por la regulación de la expresión de un pequeño número de genes *exo/pss* (Keller *et al.*, 1995; Rachwal *et al.*, 2015). Cabe destacar que en el caso de *S. meliloti* dos de estos genes son *exoK* y *exoY* (Keller *et al.*, 1995).

Otro de los descubrimientos interesantes en este estudio es el hecho que el mutante *nodA* de *S. fredii*, en comparación con la estirpe parental, muestre alteraciones en su aspecto cuando se crece en placas de YMA, así como en la cantidad de equivalentes de glucosa encontrados en el medio extracelular en presencia de genisteína. La inactivación de *nodA*, la cual provoca la incapacidad para producir NF, no altera la capacidad de HH103 para la adhesión sobre las superficies plásticas. Por el contrario, en *S. meliloti* los NF son necesarios para desarrollar la arquitectura tridimensional del *biofilm* (Fujishige *et al.*, 2008), lo que sugiere que se han podido desarrollar diferentes estrategias de formación de *biofilm* en diferentes estirpes de *Sinorhizobium*.

El EPS juega un papel esencial en la invasión del nódulo en simbiosis con leguminosas que forman nódulos indeterminados, como por ejemplo las interacciones entre *S. meliloti*-*Medicago* o *R. leguminosarum* bv. *trifolii*-*Trifolium* (Janczarek, 2011 y referencias contenidas). Por otro lado, aunque tradicionalmente el EPS no se ha considerado esencial en la simbiosis con plantas formadoras de nódulos determinados, trabajos recientes han demostrado que la producción de formas alteradas de este polisacárido puede dar lugar a deficiencias en las interacciones *B. japonicum* USDA110-soja y *M. loti*-*L. japonicus* (Quelas *et al.*, 2010; Kelly *et al.*, 2013). Estos resultados se pueden explicar por el reciente descubrimiento de un receptor de tipo LysM en *lotus*, el

cual percibe la presencia del EPS y es capaz de bloquear la infección cuando se detectan formas no apropiadas de este polisacárido (Kawaharada *et al.*, 2015).

Esto genera una serie de cuestiones como ¿por qué se reprime la producción de EPS en *S. fredii* HH103 por los flavonoides presentes en los exudados de las raíces de las leguminosas? *S. fredii* HH103 presenta un rango de hospedador amplio (Margaret *et al.*, 2011), lo que permite el estudio de estas señales moleculares con diferentes leguminosas hospedadoras. En relación con los polisacáridos superficiales, sólo se ha probado que los GC son esenciales para la nodulación de todas las plantas probadas hasta ahora (Crespo-Rivas *et al.*, 2009). En trabajos anteriores, se ha analizado la capacidad simbiótica de un derivado de *S. fredii* HH103 deficiente en la producción de EPS (mutante en *exoA*). Este mutante fue capaz de inducir la aparición de nódulos fijadores de nitrógeno en diferentes leguminosas analizadas, ya sean formadoras de nódulos indeterminados (*G. uralensis* y *C. cajan*) o determinados (*G. max* y *V. unguiculata*), sugiriendo la poca importancia de este polisacárido en la capacidad simbiótica en HH103. De hecho, con soja (*G. max*) el derivado *exoA* no sólo dio lugar a una ligera mejora de la capacidad simbiótica, sino que fue incluso más competitivo en la nodulación con esta planta (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014; Parada *et al.*, 2006), lo que sugiere que, al menos con esta leguminosa, la presencia del EPS puede tener un ligero efecto negativo sobre la simbiosis. Sin embargo, este no sería siempre el caso, ya que se han dado resultados opuestos en la interacción con caupí (*cowpea*, *V. unguiculata*), en la cual el mutante *exoA* mostró una ligera disminución en simbiosis y una menor competitividad que la estirpe parental (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014; Parada *et al.*, 2006).

En resumen, hemos mostrado que los flavonoides inductores de genes *nod* en *S. fredii* HH103, además de promover la producción de los NF y la liberación de los efectores a través del T3SS, modifican la superficie bacteriana mediante la represión de la producción del EPS. Este cambio es diferente del descrito en otros rizobios como *S. fredii* NGR234, donde se reprime el KPS y se induce un nuevo tipo de LPS, o *S. meliloti* y *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, en los cuales se incrementa la producción de EPS tras ser tratados con flavonoides. Por lo tanto, este estudio representa un nuevo ejemplo de que

los mecanismos encontrados en bacterias modelo no siempre están presentes en otras bacterias relacionadas

Capítulo IV. Caracterización de los genes *mucR1* y *mucR2* de *S. fredii* HH103*

1. Introducción

La producción de exopolisacárido (EPS) en los diferentes rizobios está sometida a muchos y diferentes sistemas reguladores (Janczarek, 2011). Entre ellos, se encuentra MucR, un regulador transcripcional de tipo MucR/Ros que presenta un dominio de dedos de zinc (*zinc finger*) Cys₂-His₂ (Keller *et al.*, 1995), lo que le permite regular la expresión de determinados genes mediante su unión directa a secuencias palindrómicas (Ros/MucR *boxes*) localizadas en las regiones promotoras de los mismos (D'Souza-Ault *et al.*, 1993; Bertram-Drogatz *et al.*, 1997; Janczarek y Skorupska, 2007;). Según algunos autores, este dominio regulador podría ser el posible ancestro de la estructura de las proteínas con motivos de dedos de zinc de los organismos eucarióticos, que lo habrían obtenido a través de transferencia horizontal (Bouhouche *et al.*, 2000; Baglivo *et al.*, 2009; Netti *et al.*, 2013). MucR/Ros está implicado en diversos procesos, como producción de polisacáridos extracelulares, motilidad, control ciclo celular, virulencia, etc., en diferentes géneros de bacterias entre los que se encuentran *Pseudomonas*, *Caulobacter*, *Brucella*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (Close *et al.*, 1985; Cooley *et al.*, 1991; Keller *et al.*, 1995; Tiburtius *et al.*, 1996; Chou *et al.*, 1998; Janczarek y Skorupska, 2007; Fumeaux *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015).

Teniendo en cuenta la cantidad de procesos en los que interviene este regulador, y siendo uno de ellos la regulación de la producción de EPS, se procedió al estudio de los genes *mucR* de *S. fredii* HH103 y su posible implicación tanto en la producción de los diferentes polisacáridos como en la simbiosis con diferentes plantas hospedadoras.

* La mayoría de los resultados expuestos en este capítulo han sido publicados en la revista *Molecular Plant-Microbe Interactions*:

Acosta-Jurado S, Alias-Villegas C, Navarro-Gómez P, Zehner S, Murdoch P D, Rodríguez-Carvajal M A, Soto M J, Ollero F J, Ruiz-Sainz J E, Göttfert M and Vinardell J M. 2016a. The *Sinorhizobium fredii* HH103 MucR1 global regulator is connected with the

nod regulon and is required for efficient symbiosis with *Lotus burttii* and *Glycine max* cv. Williams. Mol Plant Microbe Interact. 29:700-712

2. Resultados

2.1. *S. fredii* HH103 posee dos copias del gen *mucR*

La obtención y el análisis de la secuencia del genoma de *S. fredii* HH103 ha revelado la presencia de dos copias del gen *mucR* en esta estirpe (Weidner *et al.*, 2012; Vinardell *et al.*, 2015). Una de ellas, *mucR1* (SFHH103_0694), se localiza en el cromosoma y codifica una proteína de 143 aminoácidos (~15,7 KDa) que es 97% y 80% idéntica a los reguladores transcripcionales MucR y RosR de *S. meliloti* 1021 y *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* respectivamente. La segunda copia, *mucR2* (psfHH103d_392), se encuentra en el plásmido simbiótico, cerca del gen *nodD1*, y codifica una proteína de 142 aminoácidos (~15,2 KDa) con una identidad del 76% con MucR1 de *S. fredii* HH103. Estas dos proteínas son 100% idénticas a las correspondientes proteínas recientemente descritas en *S. fredii* CCBAU45436 (Jiao *et al.*, 2016).

Tabla 12. Porcentaje de identidad de las proteínas de tipo MucR/Ros en diferentes especies en comparación con las mismas de *S. fredii* HH103.

		<i>S. fredii</i> HH103 (%)	
		MucR1 (143 aa)	MucR2 (142 aa)
		76	
<i>S. fredii</i> CCBAU45436	MucR1 (143 aa)	100	76
	MucR2 (142 aa)	76	100
<i>S. fredii</i> NGR234	MucR1 (143 aa)	99	76
	MucR2 (143 aa)	90	84
<i>S. meliloti</i> 1021	MucR (143 aa)	97	75
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	RosR (143 aa)	80	61
<i>A. tumefaciens</i>	Ros (142aa)	80	59
<i>A. radiobacter</i>	RosAR (143aa)	82	64
<i>C. crescentus</i>	MucR (142 aa)	51	41
<i>B. abortus</i>	MucR (142 aa)	61	49

2.2. Construcción de mutantes en los genes *mucR1* y *mucR2*.

Para iniciar la caracterización de los genes *mucR1* y *mucR2* de *S. fredii* HH103 tanto en condiciones de vida libre como en simbiosis con plantas, se generaron mutantes en cada uno de estos genes. En el caso de *mucR1* se construyeron dos mutantes: SVQ706, en el que se llevó a cabo una delección del gen completo, y SVQ721, en el que la mutación se

realizó mediante la inserción del casete *lacZ*-Gm^R. En el caso de *mucR2* sólo se obtuvo un mutante por introducción del casete *lacZ*-Gm^R (mutante SVQ719). Además, se construyó un doble mutante Δ *mucR1 mucR2::lacZ*-Gm^R, que se denominó SVQ720. De todos estos mutantes sólo se complementó (mediante la introducción del gen silvestre *en cis*) a SVQ706, ya que en los experimentos posteriores se comprobó que sólo la inactivación de *mucR1* (y no la de *mucR2*) dio lugar a alteraciones en los fenotipos estudiados. En este capítulo se usarán los términos Δ *mucR1* y Δ *mucR1C* para designar al mutante deleciónado en *mucR1* y a su versión complementada, respectivamente.

2.3. *S. fredii* HH103 MucR1 es un regulador positivo de la producción de EPS

Las proteínas MucR y RosR se han descrito como reguladores involucrados en la producción de polisacáridos en diferentes rizobios (Janczarek *et al.*, 2011). Por ello, se analizó la producción de EPS de los diferentes mutantes *mucR* de HH103 en placas de YMA, y además, en presencia y ausencia de genisteína, ya que en *S. fredii* HH103 la producción de EPS se reduce en presencia de flavonoides inductores (Vinardell *et al.*, 2004a; Acosta-Jurado *et al.*, 2016b). Independientemente de la presencia de flavonoides, los mutantes en *mucR1* mostraron una apariencia rugosa, lo que sugería una reducción drástica de la producción de EPS (**Figura 40**). En el caso del mutante en *mucR2*, la mucosidad fue similar a la de la estirpe silvestre, al igual que en la estirpe complementada del mutante en *mucR1* SVQ706. En presencia de genisteína, todas las estirpes mostraron un aspecto rugoso similar al de la estirpe silvestre (**Figura 40**).

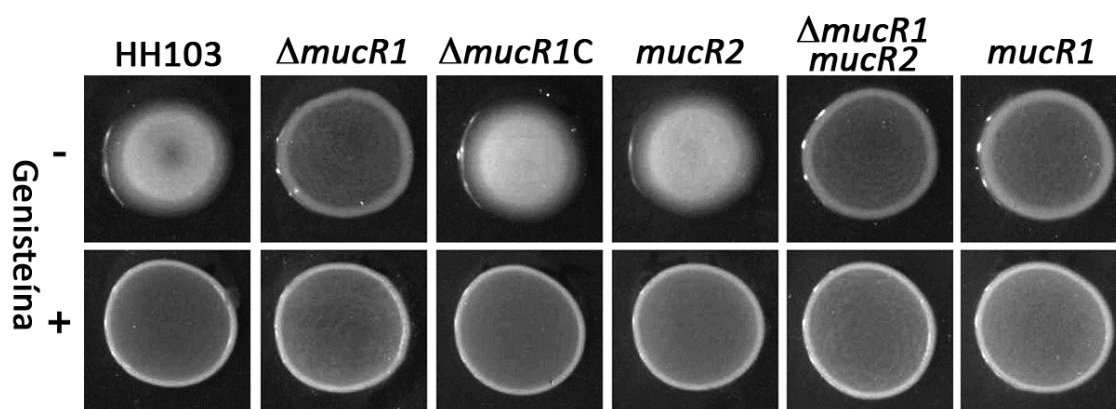


Figura 40. Mucosidad en placas de YMA de *S. fredii* HH103 Rif^R y los diferentes mutantes en los genes *mucR1* y *mucR2* en ausencia (fila superior) o en presencia (fila inferior) de genisteína. El mutante *mucR1* por deleción está anotado como Δ *mucR1*, mientras que los mutantes generados con el cassette *lacZ* Δ p-Gm^R están anotados como *mucR1* o *mucR2*. La estirpe complementada de Δ *mucR1* está indicada como Δ *mucR1C*. Fuente: Acosta-Jurado *et al.* (2016c).

Para comprobar si la reducción en la mucosidad de los mutantes en *mucR1* se debía a una reducción en la producción de EPS, se procedió a cuantificar la cantidad de equivalentes de glucosa presente en los sobrenadantes de cultivos líquidos de estas estirpes en medio YM. Estos experimentos mostraron que el mutante $\Delta mucR1$ sólo fue capaz de producir $17,4 \pm 6,2$ μg de azúcar por mililitro de sobrenadante, mientras que la estirpe silvestre produjo $83,2 \pm 16,8$ $\mu\text{g/mL}$, cantidad similar a la producida por $\Delta mucR1C$, $119,2 \pm 32,5$ $\mu\text{g/mL}$. Todas las estirpes sufrieron una reducción de la cantidad de azúcar producido en el sobrenadante en presencia de flavonoides: $6,9 \pm 0,8$; $4,7 \pm 1,0$ y $6,7 \pm 5,2$ $\mu\text{g/mL}$ en HH103, $\Delta mucR1$ y $\Delta mucR1C$, respectivamente.

Para averiguar si los cambios observados se debían efectivamente a un efecto sobre la producción de EPS, e indagar si dichos cambios eran sólo cuantitativos o también cualitativos, se realizaron estudios de resonancia magnética nuclear (H-RMN) de los polisacáridos extracelulares de HH103, $\Delta mucR1$ y $\Delta mucR1C$. Aunque el mutante $\Delta mucR1$ presentó señales correspondientes al EPS silvestre, la intensidad de estas señales fue muy débil en comparación con la de las obtenidas en la estirpe silvestre, lo que confirmó una reducción drástica de la producción de EPS en $\Delta mucR1$. La introducción de una copia silvestre de *mucR1* en el mutante reestableció de nuevo la intensidad de los picos obtenidos en el espectro, que fue muy similar al de la estirpe silvestre (**Figura 41**).

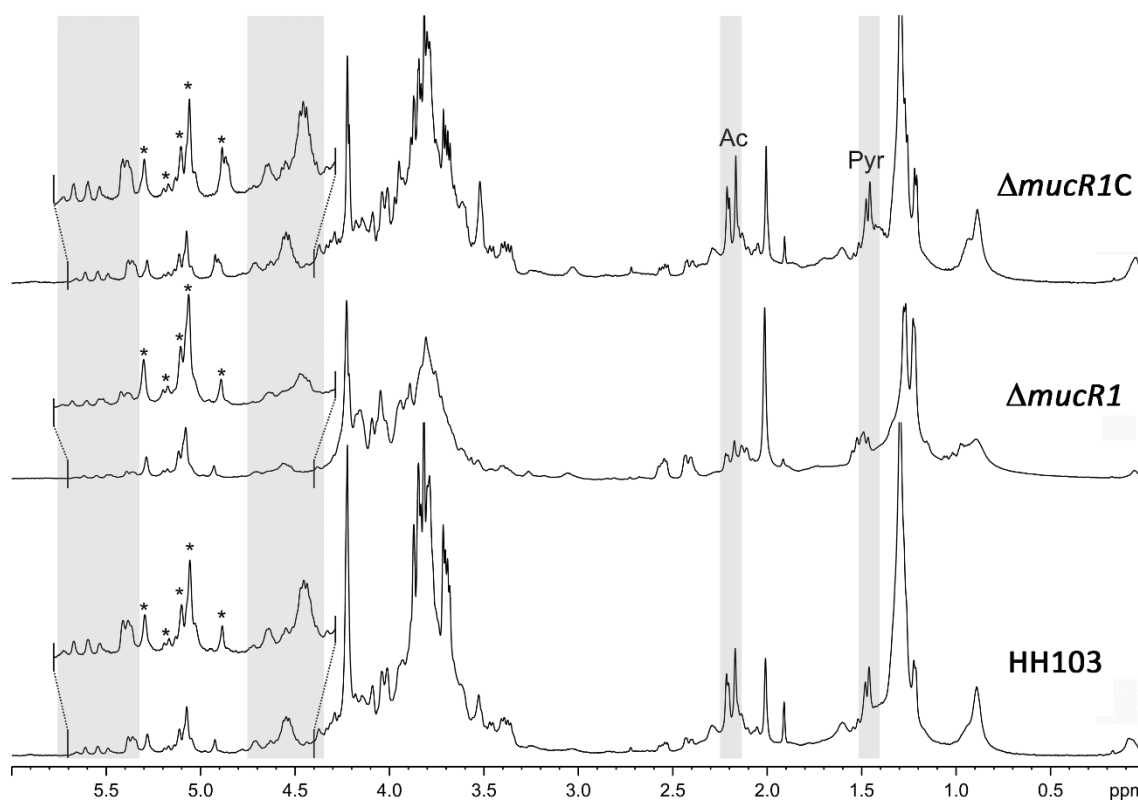


Figura 41. Espectro de H-RMN (500 MHz, 353 K) de los polisacáridos extracelulares aislados de *S. fredii* HH103 Rif^R, HH103 Δ *mucR1*, y HH103 Δ *mucR1C*. Las señales correspondientes al EPS están sombreadas en gris. Las señales de grupos acetilos (Ac) y piruvatos (Pyr) están indicadas. Las señales correspondientes a la región anomérica del EPS están ampliadas en la izquierda. Las señales residuales de las mananas presentes en el medio de cultivo se usaron como referencia (marcadas con un asterisco). Fuente: Acosta-Jurado *et al.* (2016c).

2.4. La mutación en *mucR1* afecta a las capacidades de formación de *biofilm* y auto-agregación de *S. fredii* HH103

Debido a que en *S. fredii* HH103 el EPS es esencial en la formación de biopelículas sobre superficies plásticas y de vidrio (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014), se llevó a cabo el análisis de la capacidad formadora de *biofilm* por parte del mutante Δ *mucR1* y de su versión complementada. Para ello, estas estirpes, además de la silvestre, se cultivaron en medio MGM en placas multipocillos de poliestireno durante 48h en presencia y ausencia de genisteína, y después se midió la cantidad de *biofilm* formado mediante tinción con cristal violeta. La formación de *biofilm* del mutante Δ *mucR1* fue significativamente mayor que la de la estirpe parental y no se afectó por la presencia de genisteína, mientras que la introducción de la copia silvestre del gen reestableció los niveles silvestres de formación de *biofilm* (Figura 42). Del mismo modo que en el mutante Δ *mucR1*, el mutante *mucR1::lacZ-Gm^R* y el doble mutante Δ *mucR1*

mucR2::lacZ-Gm^R tuvieron el mismo comportamiento en cuanto a la formación de *biofilm* (datos no mostrados). Aunque este resultado pudiera parecer sorprendente dado que la inactivación de *mucR1* conlleva una reducción drástica de la producción de EPS, la naturaleza del *biofilm* formado por los mutantes en *mucR1* es diferente a la del *biofilm* formado por la estirpe parental (sobre la superficie del fondo del pocillo y adherido al mismo): una capa flotante y translúcida que se dispone en la interfase aire-líquido (Figura 42).

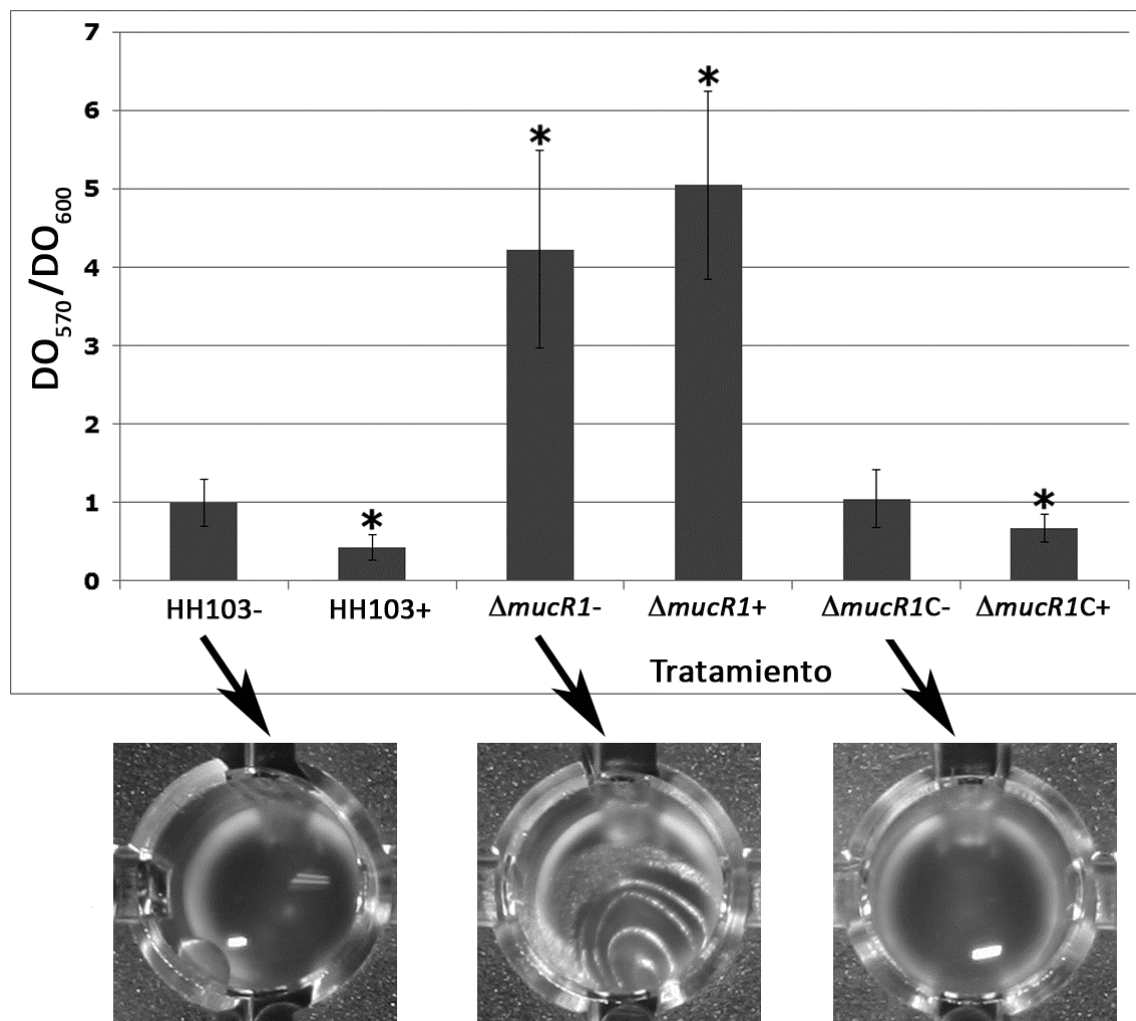


Figura 42. Formación de *biofilm* por *S. fredii* HH103 Rif^R, su derivado *mucR1* (Δ*mucR1*) y la estirpe complementada de este mutante (Δ*mucR1C*) crecidos en presencia (+) o ausencia (-) de genisteína. Los asteriscos denotan diferencias significativas (valor de $p < 0,05$) en comparación con el silvestre (-). Los datos presentados son la media de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado, en cada experimento, se midieron al menos 12 pocillos por cada tratamiento. En la parte inferior se muestra un pocillo representativo del silvestre, del mutante Δ*mucR1* y Δ*mucR1C* crecidos en ausencia de genisteína. Fuente: Acosta-Jurado *et al.* (2016c).

La formación de *biofilm* también se analizó sobre superficies de cristal. Para ello se introdujo por conjugación el plásmido pSKDSRED (que confiere fluorescencia roja constitutiva) a *S. fredii* HH103, su mutante $\Delta mucR1$ y la estirpe complementada. Los cultivos en medio MGM de las diferentes estirpes con el plásmido se dispusieron en cubetas Coplin de cristal con una serie de portacristales y se incubaron a 28 °C durante 96 horas (**Figura 43**). El *biofilm* formado sobre los portacristales a las 24 y 96 horas se analizó mediante microscopía de epifluorescencia y a diferentes niveles de altura del portacristal: 5, 28 y 49 mm, desde la base hasta la superficie respectivamente, coincidiendo esta última con la interfase aire-líquido (**Figuras 43**).

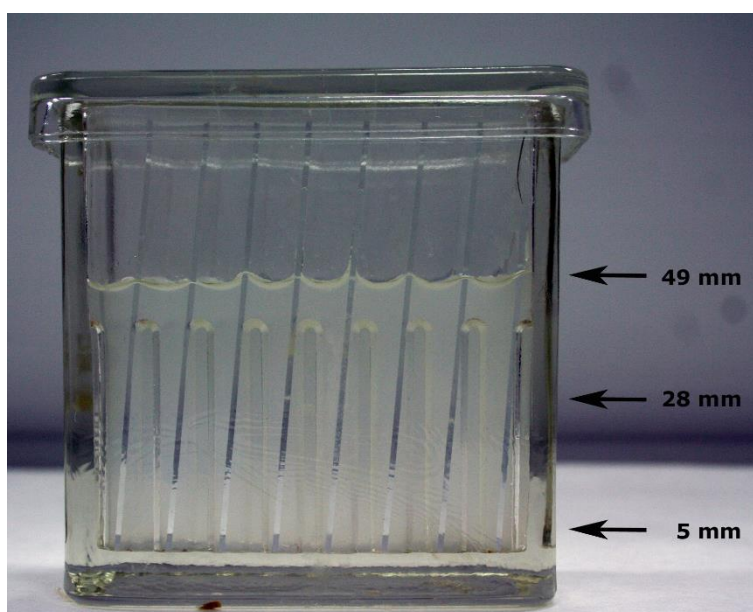


Figura 43. Cubeta Coplin con varios portacristales usados para el análisis de la formación de *biofilm* sobre cristal de las diferentes estirpes de *S. fredii* HH103. A la derecha se indican las diferentes alturas de los portacristales a las que se analizó la formación de *biofilm* (figuras XX y XX). Fuente: Acosta-Jurado *et al.* (2016c).

Ya a las 24 horas después de la inoculación se observó que el mutante $\Delta mucR1$ mostraba una mayor formación de *biofilm* en la interfase aire-líquido (a la altura de 49 mm en el portacristal) en comparación con HH103 y con la estirpe complementada, en los cuales el patrón de unión a la superficie de vidrio fue más disperso (**Figura 44**).

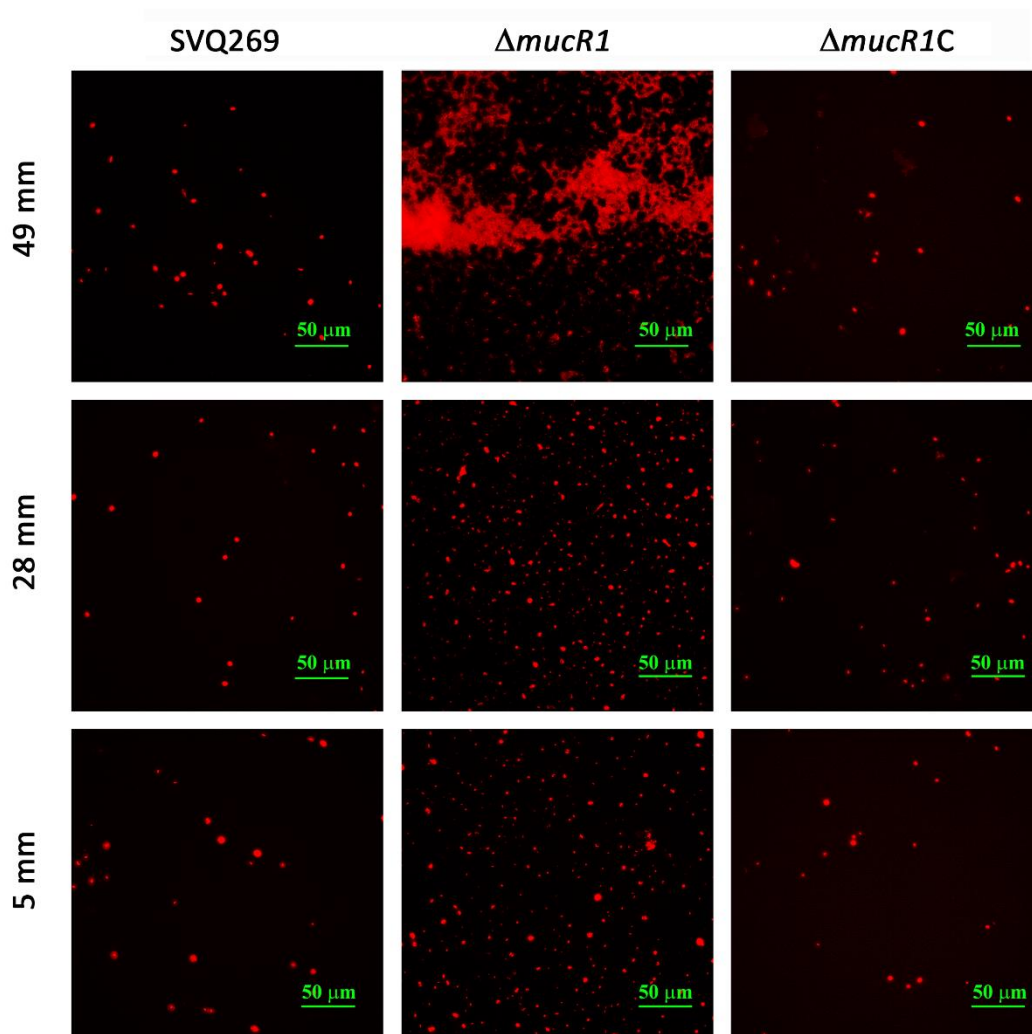


Figura 44. Capacidad formadora de biofilm de *S. fredii* HH103 Rif^R, el mutante Δ *mucR1* y la estirpe complementada (Δ *mucR1C*) portando el plásmido pSKDSRED sobre portacristales tras 24 horas de incubación en medio MGM. La cantidad de *biofilm* se puede estimar por la fluorescencia emitida por la población de bacterias unidas. Las imágenes se tomaron a diferentes alturas del portacristal (indicadas en la zona izquierda) usando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse Ti-U con longitudes de onda de excitación y emisión de 554 nm y 586 nm respectivamente. Fuente: Acosta-Jurado *et al.* (2016c).

A las 96 horas, la adhesión de células Δ *mucR1* al vidrio en la interfase aire-líquido fue mucho más evidente, mientras que en la estirpe parental y complementada se comenzó a formar una capa similar a la formada por el mutante pero mucho menos estructurada (**Figura 45**). Hay que resaltar que la capacidad de adhesión mostrada por las tres estirpes a zonas sumergidas del portacristal fue mucho menos evidente, pero de igual modo mayor en el caso del mutante Δ *mucR1*.

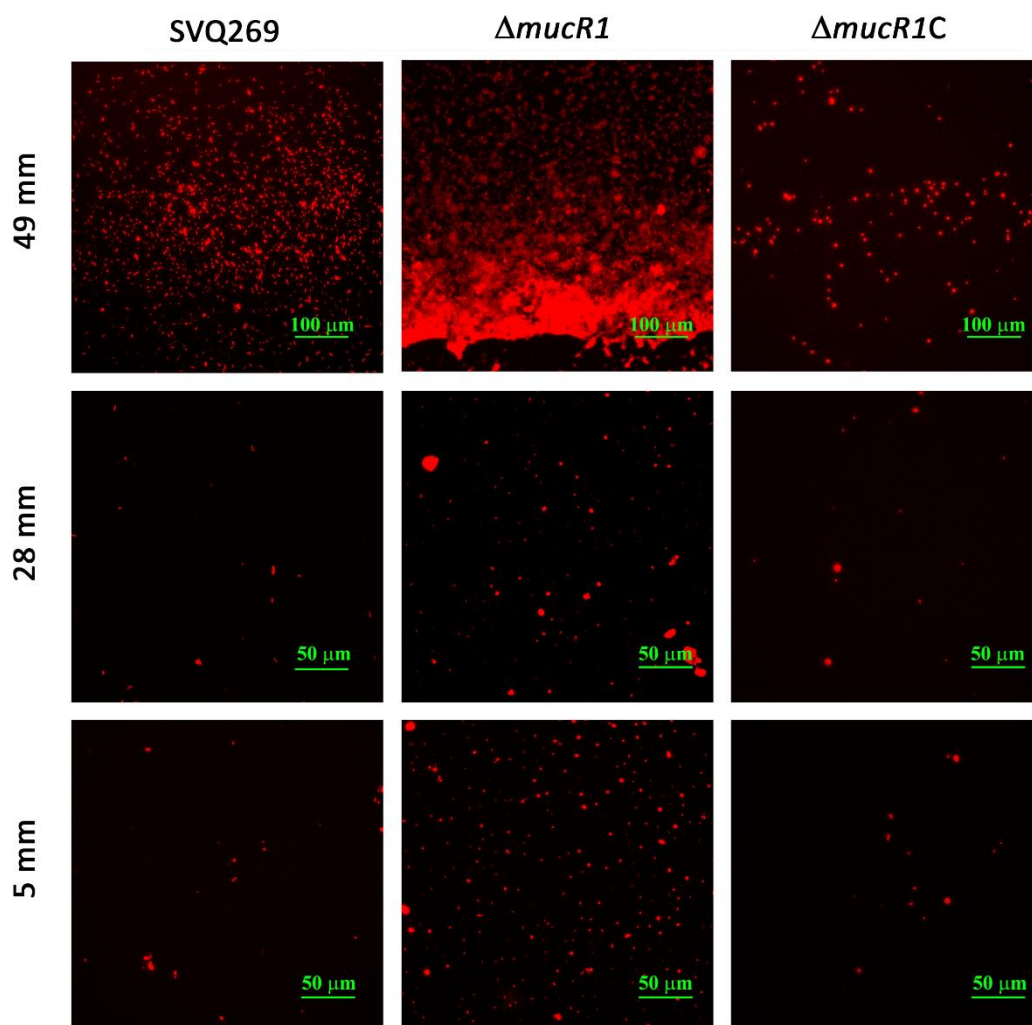


Figura 45. Capacidad formadora de *biofilm* de *S. fredii* HH103 Rif^R, el mutante Δ *mucR1* y la estirpe complementada (Δ *mucR1C*) portando el plásmido pSKDSRED sobre portacristales después de 96 horas de incubación en medio MGM. La cantidad de *biofilm* se puede estimar por la fluorescencia emitida por la población de bacterias unidas. Las imágenes se tomaron a diferentes alturas del portacristal (indicadas en la zona izquierda) usando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse Ti-U con longitudes de onda de excitación y emisión de 554 nm y 586 nm respectivamente. Fuente: Acosta-Jurado *et al.* (2016c).

Diversas alteraciones en la producción de polisacáridos superficiales pueden afectar a la capacidad de auto-agregación de la bacteria. En *S. fredii* HH103 se había observado que la inactivación del gen *greA*, que modifica el lipopolisacárido (LPS) producido, incrementa notablemente esta capacidad (Margaret *et al.*, 2013). En esta Tesis se ha querido analizar si modificaciones en la producción del EPS también afectan a la auto-agregación. Para ello se cultivaron la estirpe silvestre, el mutante en *mucR2* y los diferentes mutantes en *mucR1*, así como un mutante en *exoA* (SVQ530; *exoA::lacZ::Gm^R*) incapaz de producir EPS (Parada *et al.*, 2006), en medio MGM durante

96 horas en agitación (180 rpm). Los resultados, (**Figura 46**) muestran que las estirpes en las que el gen *mucR1* se había inactivado (ΔmucR1 , *mucR1::lacZ*-Gm^R y el doble mutante $\Delta\text{mucR1 mucR2::lacZ}$ -Gm^R) exhibieron una elevada capacidad de auto-agregación, incluso con agitación continua, mientras que la estirpe silvestre, el mutante en el gen *mucR2* y la estirpe ΔmucR1C , mostraron una auto-agregación casi nula. El mutante *exoA* exhibió una capacidad de auto-agregación intermedia que fue significativamente diferente de las de la estirpe HH103 y el mutante ΔmucR1 (**Figura 46**).

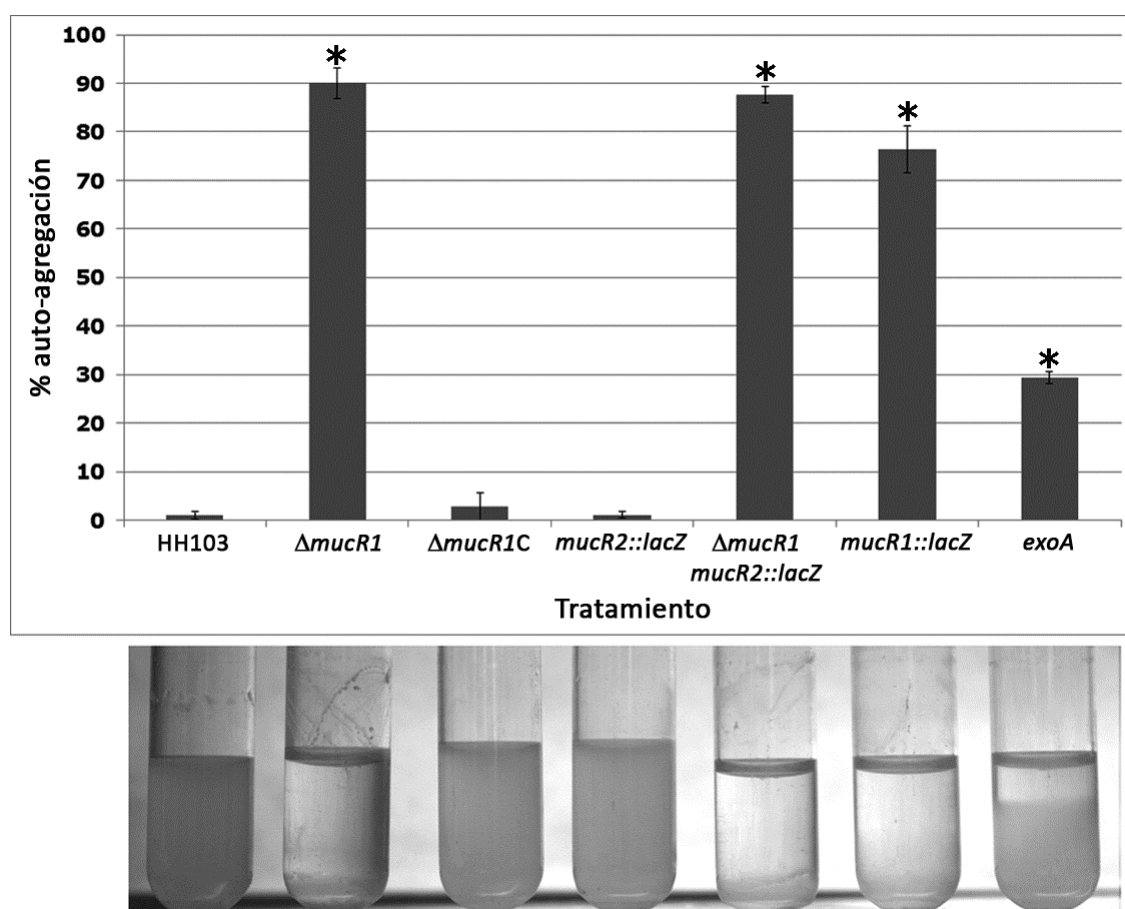


Figura 46. Ensayo de auto-agregación de *S. fredii* HH103 Rif^R y sus derivados *mucR1* y/o *mucR2*. También se incluyó un mutante de HH103 en el gen *exoA* incapaz de producir EPS. La presencia de un asterisco denota una diferencia significativa (valor de $p < 0,05$) respecto del silvestre. Fuente: Acosta-Jurado *et al.* (2016c).

2.5. La mutación en el gen *mucR1* de *S. fredii* HH103 no afecta a la producción de LPS, KPS y GC del espacio periplásmico, pero aumenta la cantidad de GC extracelulares.

Debido a que existen genes que intervienen en la producción de más de un polisacárido, se decidió investigar si las mutaciones en *mucR1* o *mucR2* podían afectar a otros polisacáridos superficiales. Por un lado, se realizaron extracciones enriquecidas en lipopolisacárido (LPS) y en polisacárido capsular tipo antígeno K (KPS) de las diferentes estirpes y se analizaron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y nativas respectivamente. Ninguna de las estirpes analizadas mostró un perfil de LPS o KPS diferente al de la estirpe parental HH103 (**Figura 47**, paneles B y C). Asimismo, se analizaron extractos crudos del mutante $\Delta mucR1$ mediante H-RMN para obtener información estructural del KPS y de los glucanos cíclicos (GC) del espacio periplásmico. El espectro obtenido fue idéntico al de HH103 (**Figura 47**, panel A).

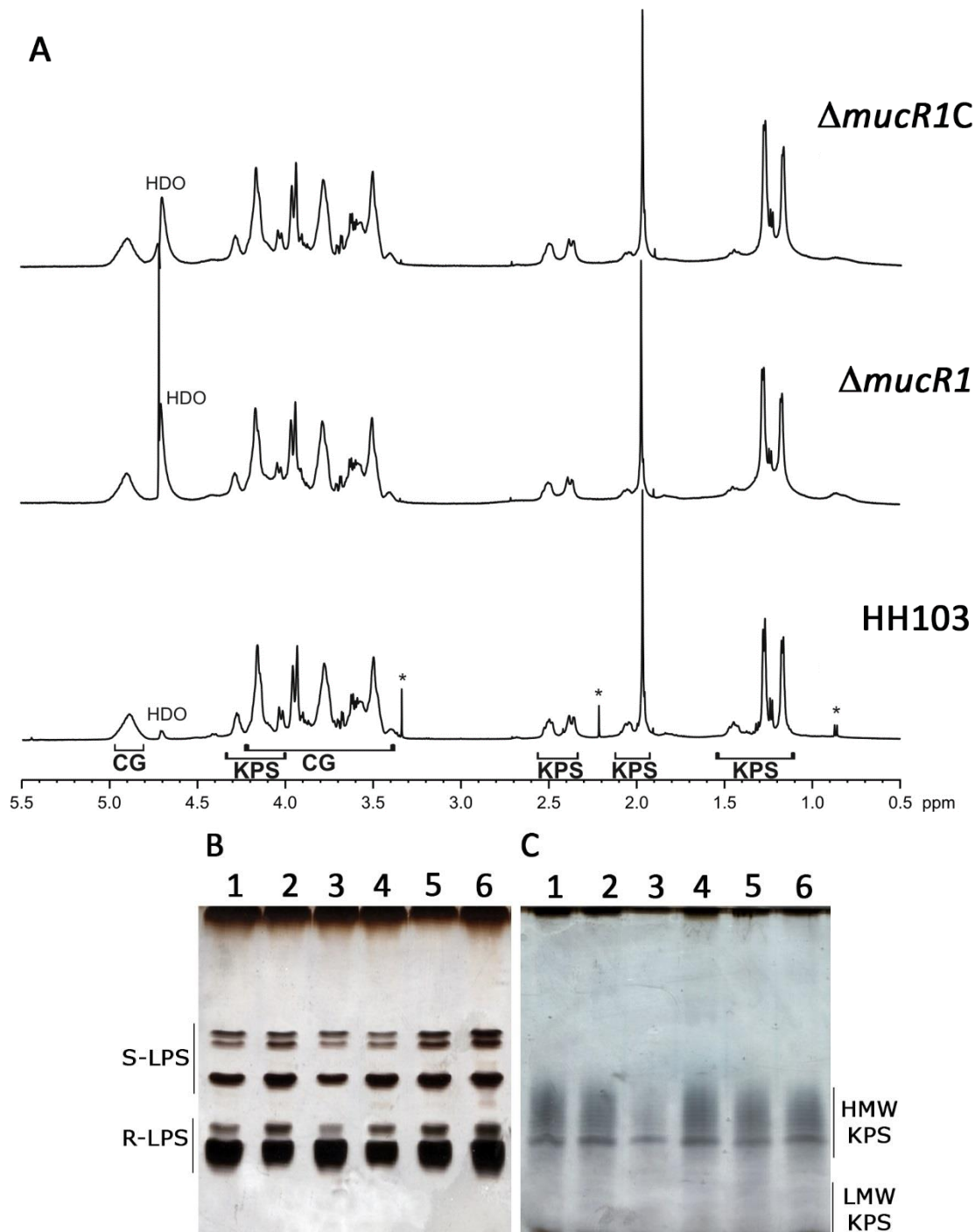


Figura 47. (A) Espectro de H-RMN (500 MHz) de extractos crudos celulares que contienen polisacáridos superficiales de *S. fredii* HH103 Rif^R, HH103 Δ mucR1 y HH103 Δ mucR1C. Las señales correspondientes al KPS, GC o el solvente (HDO, agua deuterada) están indicadas. (B) SDS-PAGE y tinción con plata de extractos crudos de LPS y (C) PAGE y tratamiento con azul alcian y tinción con plata de extractos crudos de KPS de *S. fredii* HH103 Rif^R y sus derivados *mucR1* y/o *mucR2*. En ambos casos están indicados tanto el LPS liso como el rugoso (S-LPS y R-LPS, respectivamente), al igual que el KPS de alto y bajo peso molecular (HMW-KPS y LMW-KPS, respectivamente). Carril 1; HH103 Rif^R; carril 2, HH103 Δ mucR1; carril 3, HH103 Δ mucR1C; carril 4, HH103 *mucR2::lacZ* Δ p-Gm^R; carril 5, HH103 Δ mucR1 *mucR2::lacZ* Δ p-Gm^R; carril 6, HH103 *mucR1::lacZ* Δ p-Gm^R. Fuente: Acosta-Jurado *et al.* (2016c).

Por último, se analizó la producción de GC extracelulares en el mutante $\Delta mucR1$. Para ello se analizaron los sobrenadantes de cultivos líquidos en medio YM. El EPS se recuperó de los sobrenadantes mediante precipitación con etanol, mientras que para obtener los GC extracelulares, el sobrenadante resultante una vez extraído el EPS se concentró y se precipitó con etanol, de tal modo que se obtiene una fracción de bajo peso molecular que contiene los GC. Este precipitado se dializó y concentró para los subsiguientes análisis de H-RMN. Estos estudios revelaron que en la estirpe $\Delta mucR1$, además de una disminución de la cantidad de EPS, se produce un gran aumento en la cantidad de GC extracelulares en comparación con lo que ocurre en la estirpe parental y en la estirpe complementada. Para estudiar si este hecho era simplemente una consecuencia de la disminución en la producción de EPS o era otro de los efectos de la inactivación del gen *mucR1*, se realizó el mismo análisis del sobrenadante del mutante *exoA* de HH103. Este análisis permitió comprobar que dicho mutante sufría un aumento de la cantidad de GC extracelulares similar al que ocurre en el mutante $\Delta mucR1$ (**Figura 48**).

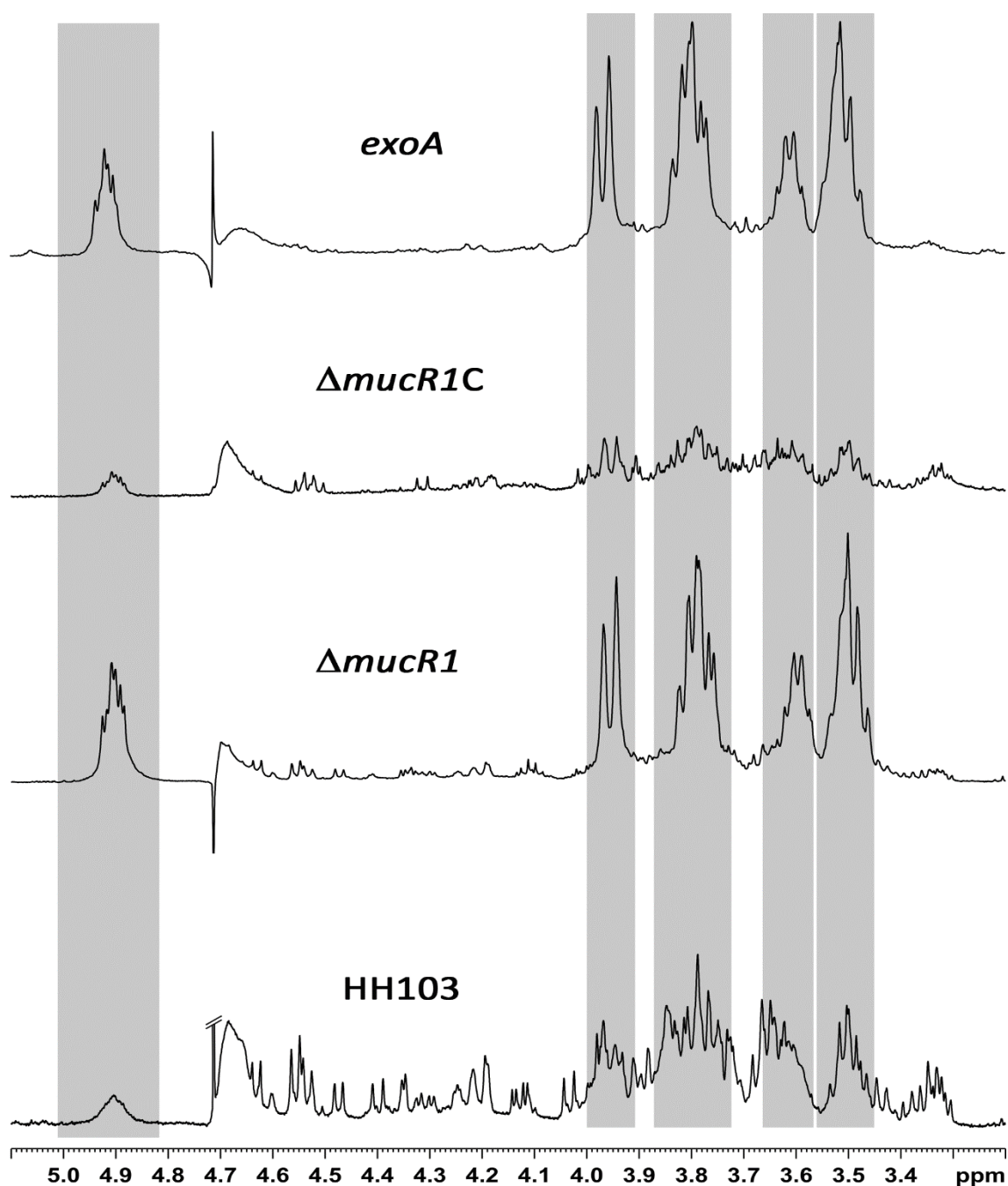


Figura 48. Espectro de H-RMN (500 MHz, 303 K) de fracciones que contienen GC extracelulares de sobrenadantes de cultivos líquidos de *S. fredii* HH103, HH103 Δ *mucR1*, HH103 Δ *mucR1C*, y un derivado *exoA* de HH103. Las señales correspondientes a los GC están sombreadas en gris. Fuente: Acosta-Jurado *et al.* (2016c).

2.6. La mutación en *mucR1* altera la tasa de crecimiento

En *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, la mutación en el ortólogo de *mucR1*, *rosR*, provoca un retraso en el crecimiento de la bacteria en medio líquido y sólido (Janczarek *et al.*, 2010).

En función de estos resultados se decidió comprobar si el mutante en *mucR1* también

tenía alterada la capacidad de crecimiento en los diferentes medios (TY, YM y MGM), que se emplean en las diferentes técnicas de caracterización de los mutantes. En todos los medios testados, la mutación provoca un retraso en el crecimiento de la bacteria, aunque llega a alcanzar la misma densidad de población que la estirpe parental. La complementación en *cis* de la mutación hace que se recupere la tasa de crecimiento silvestre. Cabe destacar que en el medio MGM, el mutante $\Delta mucR1$ no alcanza gráficamente la saturación al igual que la estirpe parental y la complementada debido a la formación del *pellicle* que provoca la floculación hacia el fondo del tubo y la adhesión de las bacterias a las paredes del tubo en la interfase aire-líquido (**Figura 49**).

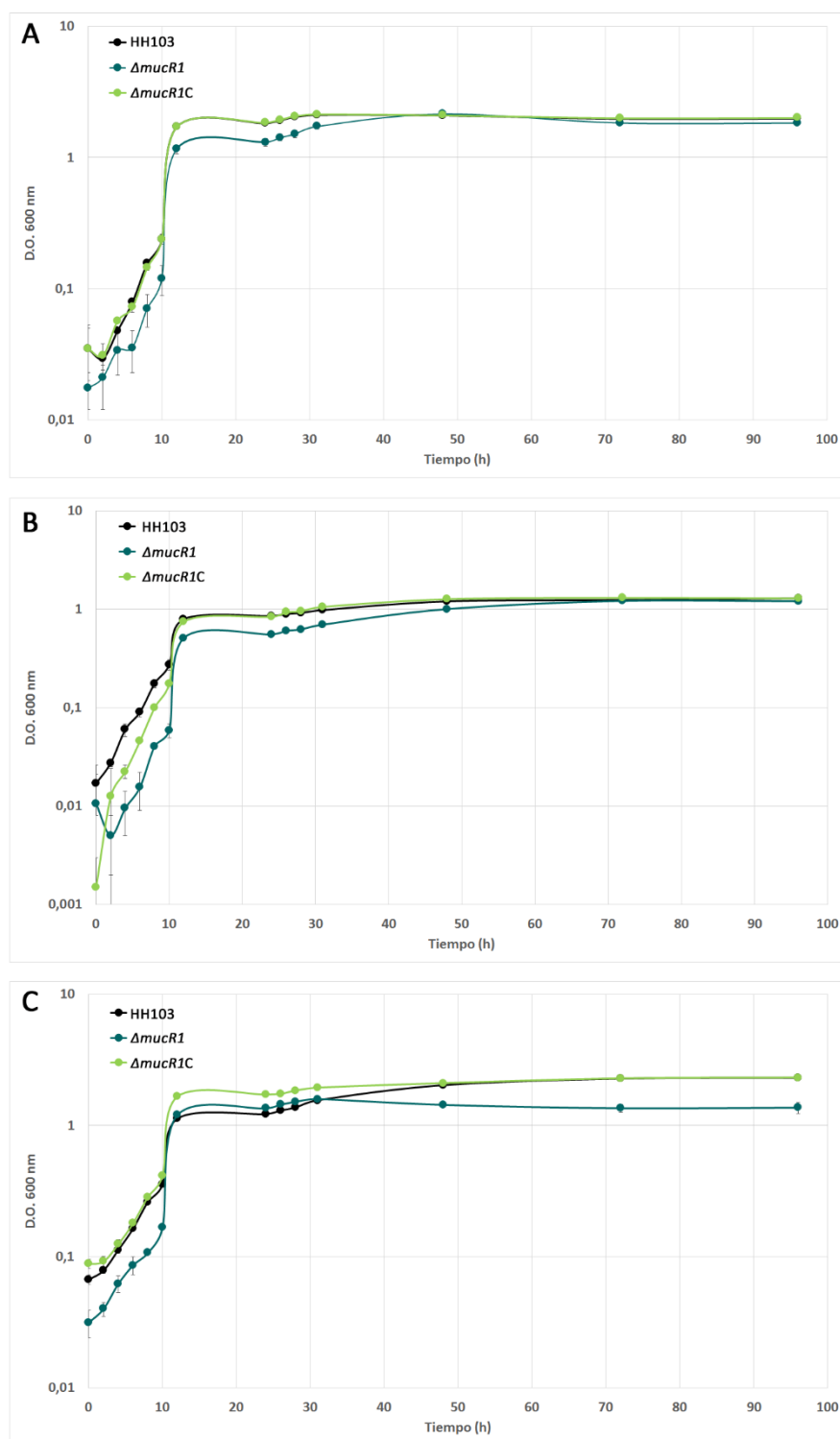


Figura 49. Curvas de crecimiento de HH103, HH103 ΔmucR1 y HH103 ΔmucR1C en medios TY (panel A), YM (panel B) y MGM (panel C).

2.7. MucR1 es un factor importante para la simbiosis de *S. fredii* HH103 con *Glycine max* cultivar Williams y *Lotus burtii*

Con objeto de investigar si la inactivación de *mucR1* afectaba la capacidad simbiótica de *S. fredii* HH103, se llevaron a cabo ensayos de nodulación de la estirpe silvestre, el mutante ΔmucR1 y la estirpe ΔmucR1C con dos especies de plantas hospedadoras, soja (*G. max*) y *L. burtii*. Además, también se investigó el fenotipo simbiótico del mutante *mucR2* y del doble mutante *mucR1 mucR2* en soja.

La inactivación del gen *mucR1*, tanto en los mutantes simples como en el doble mutante, provocó una deficiencia severa de la capacidad simbiótica de *S. fredii* HH103 tanto en soja como en *L. burtii*, de modo que las plantas inoculadas con estos mutantes mostraron un peso seco similar al de las plantas sin inocular (**Tabla 13**). Sin embargo, el efecto producido en la formación de nódulos en ambas plantas fue totalmente diferente. Mientras que en soja los mutantes afectados en *mucR1* indujeron la formación de un número de nódulos significativamente mayor en comparación con HH103, en *L. burtii* el número de nódulos inducido por ΔmucR1 fue significativamente inferior. En ambas plantas, el comportamiento de ΔmucR1C fue indistinguible del de la estirpe silvestre. Además, se comprobó la eficiencia fijadora de los nódulos inducidos por ΔmucR1 en ambas plantas mediante un ensayo de reducción de acetileno. Los resultados mostraron que los nódulos formados en soja fueron diez veces menos eficientes que los nódulos de la estirpe parental, mientras que en *L. burtii* la reducción de la eficiencia fue menos acusada (**Tabla 13**). Por otro lado, el comportamiento del mutante *mucR2* en soja fue muy similar al de la estirpe parental en los tres parámetros analizados (**Tabla 13**).

Tabla 13. Respuesta de *G. max* cv. Williams a la inoculación con *S. fredii* HH103 y sus derivados *mucR1* y/o *mucR2* ^a.

Inoculante ^b	Número de nódulos	Masa fresca de nódulos (mg)	Peso seco de la pare aérea (g) ^c
HH103 Rif ^R	58,4±10,6	834,6±208,6	2,55±0,74
HH103 ΔmucR1	126,2±49,0*	766,6±268,0	1,20±0,42*
HH103 ΔmucR1C	52,6±12,2	792,6±147,1	2,74±0,78
HH103 <i>mucR2::lacZ-Gm^R</i>	60,4±6,7	829,2±168,7	2,33±0,97

HH103 $\Delta mucR1$ $mucR2::lacZ$ -Gm ^R	118,8±21,6*	749,2±39,9	1,54±0,41*
---	-------------	------------	------------

^a Los datos representan la media de 5 jarros Leonard, cada uno de los cuales contenía dos plantas de soja. Las medidas se tomaron 42 días después de la inoculación. Todos los tratamientos se compararon individualmente con los valores de la estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. La presencia de un asterisco denota una diferencia significativa con un valor de $p < 0,05$.

^b Por cada inoculante se aislaron bacterias de 12 nódulos, y estas mostraron los marcadores de resistencia esperados.

^c El peso seco de la parte aérea de las plantas no inoculadas fue de 1,24±0,21 g por jarro.

Tabla 14. Respuesta de *L. burtii* a la inoculación con *S. fredii* HH103 y sus derivados *mucR1* y/o *mucR2* ^a.

Inoculante ^b	Número de nódulos	Peso fresco de la parte aérea (mg) ^c
HH103 Rif ^R	78,5±20,6	1180,8±386,8
HH103 $\Delta mucR1$	42,4±12,9*	235,2±36,2*
HH103 $\Delta mucR1C$	70,0±14,8	973,1±379,5

^a Los datos representan la media al menos 4 jarros, cada uno de los cuales contenía 4 plantas. Las medidas se tomaron 56 días después de la inoculación. Todos los tratamientos se compararon individualmente con los valores de la estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. La presencia de un asterisco denota una diferencia significativa con un valor de $p < 0,05$.

^b Por cada inoculante se aislaron bacterias de 12 nódulos, y estas mostraron los marcadores de resistencia esperados.

^c El peso seco de la parte aérea de las plantas no inoculadas fue de 82,6±27,1 mg por jarro.

Tabla 15. Ensayo de reducción de acetileno de *S. fredii* HH103 y su derivado *mucR1* en plantas de soja y *L. burtii*.

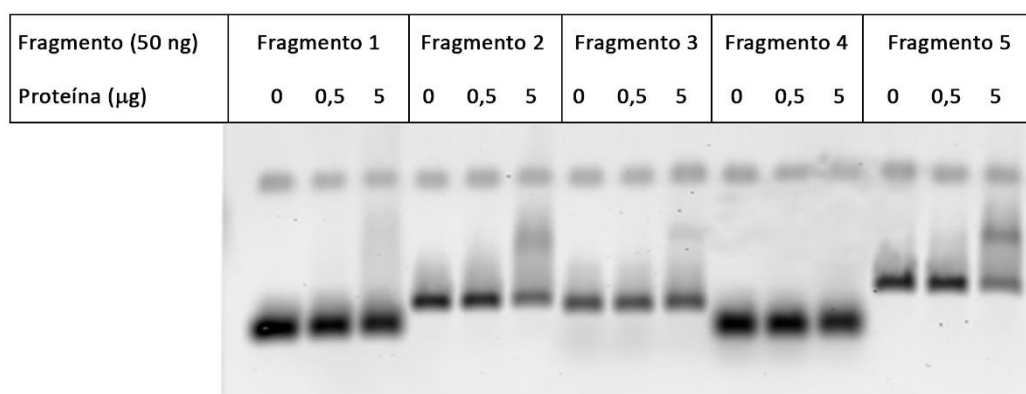
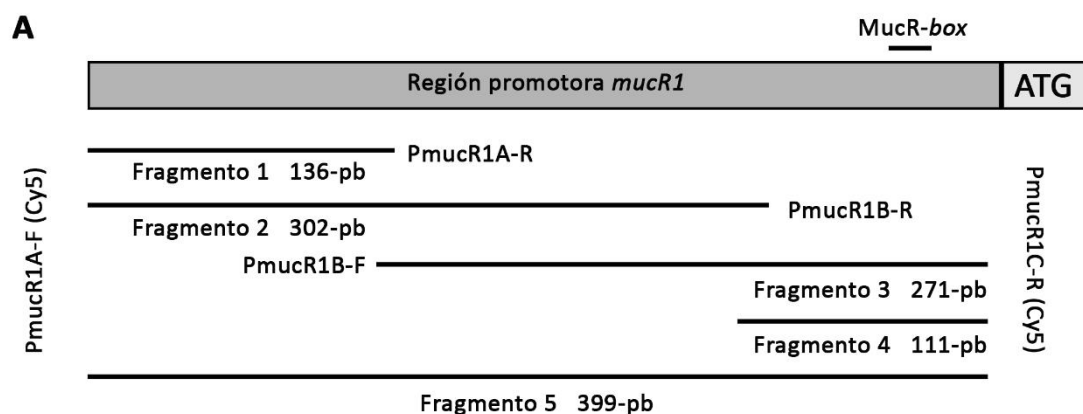
Inoculante ^b	Reducción de acetileno (nmoles de etileno por planta y hora)	
	Soja	<i>L. burtii</i>
HH103 Rif ^R	3424,7±971,2	295,6±80,8
HH103 $\Delta mucR1$	309,8±20,2	95,0±27,7

2.8. MucR1 reprime su propia transcripción mediante la unión a su propio promotor

En estudios previos se ha demostrado que los genes *mucR* de *S. meliloti* y *rosR* de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* se auto-regulan negativamente (Janczarek y Skorupska 2007; Keller *et al.*, 1995). En esta tesis hemos estudiado si la proteína MucR1 de *S. fredii* HH103 tiene algún efecto sobre la transcripción de su gen codificante. Para ello, se han seguido varias estrategias. Por un lado, se fusionó un fragmento de 408-pb de la región

promotora de *mucR1* además del codón de inicio del gen con el gen *egfp* (que codifica la proteína fluorescente verde, GFP, *Green fluorescent protein*) presente en el plásmido pPHU231. El plásmido resultante, pMUS1196, permite analizar la expresión de *mucR1* mediante medidas de fluorescencia. Dicho plásmido se introdujo en *S. fredii* HH103 Rif^R y en Δ *mucR1*. En el fondo del mutante Δ *mucR1*, la expresión de la GFP (fluorescencia/D.O.₆₀₀), dependiente del promotor de *mucR1*, fue 3,5 veces mayor ($363,19 \pm 22,01$) que la obtenida en el fondo silvestre ($100,00 \pm 4,39$), lo que sugería que también en *S. fredii* HH103 MucR1 actúa como un auto-regulador negativo.

Para comprobar si MucR1 es capaz de unirse a su propio promotor, su gen codificante se fusionó con el de la proteína GST (glutación S-transferasa) y la proteína quimérica resultante se sobre-expresó en *E. coli*. Usando una resina a la que se une la GST, la proteína recombinante se purificó y se usó en estudios de EMSA (de *electrophoretic mobility-shift assay*). Como se muestra en la **Figura 50**, MucR1 se une a un fragmento de ADN de 399-pb, que cubre la secuencia completa aguas arriba de *mucR1* de *S. fredii* (desde -7 hasta -405) (**Figura 50**, panel A, fragmento 5). Con objeto de discernir cuál era la zona concreta de unión, se usaron diferentes fragmentos internos de la secuencia promotora de *mucR1* en ensayos de EMSA. En estos nuevos ensayos se comprobó que MucR1 se unía tanto al fragmento 2 (de 302-pb, entre -405 y -104 con respecto al codón de inicio) como al fragmento 3 (de 271-pb, desde -277 a -7), los cuales solapan en 174-pb. El fragmento 3 contiene un motivo de unión de MucR conservado (de -50 a -33) según lo definido en el promotor de *mucR* de *S. meliloti* (Keller *et al.*, 1995) (**Figura 51**, panel B). Sin embargo, este sitio no está contenido en la secuencia común con el fragmento 2. De hecho, MucR1 de *S. fredii* HH103 no se une al fragmento 4 (de 111-pb, desde -117 hasta -7), el cual contiene el supuesto sitio de unión de MucR. El análisis de la secuencia de 174-pb común entre los fragmentos 2 y 3 no mostró ningún sitio de unión conocido para MucR o RosR. Del resultado de estos experimentos puede deducirse que, sorprendentemente, en *S. fredii* HH103 la unión de MucR1 a su región promotora, parece no ser dependiente de la secuencia de unión descrita en *S. meliloti*.

**B**

TTGCGGCATTTCTGATTCTGTATTTTCGGGGCAATTCCGCCACAGCGGACAATTTTAGTG
 AACTGAAATAGATATGCTGCTCGCTGACAAAAATTATGTTTTGACATTTTGACAGATCAG
 TGTTAAGCCAGTAACCGCAAAGTGTCGTCGTAATCAATACTTTGAACTGGAATTCCAGC
 TTGAGTTGTGATTCTTCTCCGTTGCTTTGAGGTGCCGAAGGGTGCGGCACCTTGGTGAC
 GGGTTTCGCTGTCGCGAATCGAGCCTTGATGTTGCGGCGGAGCAATGCTCCCGTTGCAC
 GGCTATCGCTCAGGTTCAAGGCGGAAAGCGCTGTTTCGGCGGCAATTTGCATATCCTCCC
 T **CCTGAAACCCC GTTTCAGG** CTTTGTGCTGGATTCCGATAGGAGAAAAAATG

ros consensus: $\overleftarrow{\text{TGAAATCTAGGGGTAGATTTCA}} \overrightarrow{\text{}}$
mucR S. meliloti: $\overleftarrow{\text{CCTGAAACTCTGTTTCAGG}} \overrightarrow{\text{}}$

Figura 50. (A) Ensayo de retardo en gel (EMSA) llevado a cabo para analizar la unión de MucR1 de *S. fredii* HH103 a la secuencia de su propio promotor. Los fragmentos del 1 al 4 corresponden a las diferentes partes del fragmento 5 (399-pb, desde -405 a -7). (B) Secuencia de 408-pb (405-nt aguas arriba y el codón de inicio del gen *mucR1* de *S. fredii* HH103 que se fusionó a *egfp* y mostró una auto-regulación negativa por MucR1. La secuencia sombreada en gris corresponde al solapamiento entre los fragmentos 2 y 3. La secuencia sombreada en rojo correspondiendo al posible sitio de unión de MucR definido para el promotor de *mucR* de *S. meliloti* (Keller *et al.*, 1995). Fuente: Acosta-Jurado *et al.* (2016c).

2.9. MucR1 de *S. fredii* HH103 es un regulador global

Varios estudios han documentado el papel de RosR/MucR en la regulación de diferentes aspectos de la interacción de las bacterias con hospedadores eucarióticos, no sólo en los rizobios sino también en bacterias patógenas como *Brucella abortus* y *B. melitensis* (Janczarek *et al.*, 2010; Janczarek, 2011; Caswell *et al.*, 2013; Mirabella *et al.*, 2013). En el caso de *S. fredii* HH103, MucR1 afecta a la producción de EPS y GC extracelulares, la formación de una biopelícula en la interfase aire-líquido (llamada *pellicle*), el nivel de auto-agregación, y al establecimiento de la simbiosis con las dos plantas hospedadoras testadas, soja y *L. burtii*. Esto nos llevó a analizar por transcriptómica el conjunto de genes cuya expresión se afecta por MucR1 en *S. fredii* HH103. Debido a que el número de nódulos inducidos está significativamente afectado en las dos plantas hospedadoras probadas, lo que sugiere que el mutante *mucR1* podría estar afectado al menos en fases tempranas de la interacción, decidimos realizar el análisis en presencia y ausencia de genisteína, un flavonoide inductor de los genes *nod* para HH103 (Vinardell *et al.*, 2004b).

El número de genes diferencialmente expresados (DEG, del inglés *differentially expressed genes*) en el mutante $\Delta mucR1$ de HH103 (definido como genes que mostraron valores de $[fold\ change] \geq 3,5$ o $\log_2[fold\ change] > 1,871$ mutante/silvestre) fue de 393 y 904 en ausencia y presencia de genisteína respectivamente, de los cuales 265 eran comunes a ambas condiciones (**Figura 51**, *Dataset 1*).

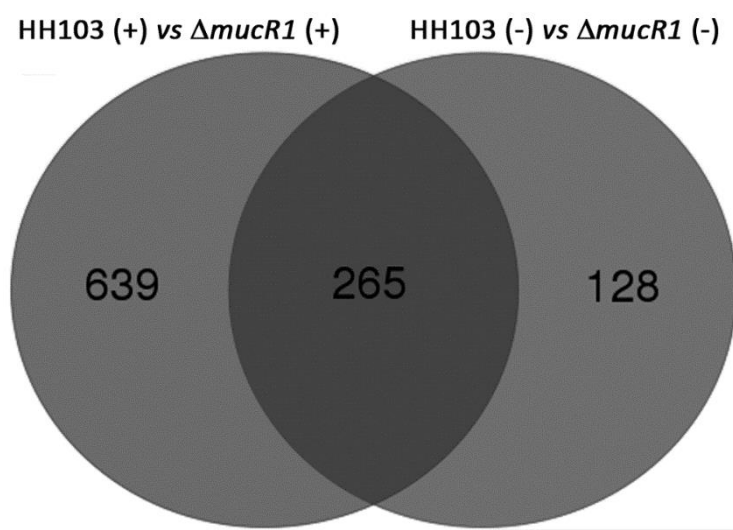


Figura 51. Número de DEG en el mutante $\Delta mucR1$ respecto a la estirpe silvestre *S. fredii* HH103 Rif^R en ausencia (-) o presencia (+) de genisteína. Fuente: Acosta-Jurado *et al.* (2016c).

Los niveles de expresión de 20 DEG se validaron mediante RT-PCR cuantitativa (*qPCR*, **Tabla 16**). Nuestros resultados apoyan a los obtenidos en otros rizobios e indican que MucR es un regulador global que afecta a la expresión de cientos de genes. La información detallada sobre los niveles de la expresión global de los genes en el silvestre y en $\Delta mucR1$ en ausencia o presencia de genisteína, así como la lista de los DEG en ambas condiciones se encuentran en los *Datasets* 2-5.

Tabla 16. Validación de los datos de RNA-Seq usando *qRT-PCR* (*qPCR*). Se midió 20 genes individuales en la estirpe de *S. fredii* HH103 y del derivado $\Delta mucR1$ tanto en presencia como ausencia de genisteína. Para la *qPCR* se calcularon los valores usando el método $\Delta\Delta Ct$ y se normalizaron por el ARNr 16S. Los datos representan los niveles de *fold-changes* en HH103 $\Delta mucR1$ con respecto a HH103.

Gen	ID del gen / Secuencia Promotor	Ausencia de genisteína		Presencia de genisteína	
		RNA-Seq	qPCR	RNA-Seq	qPCR
	psfHH103d_118	4,89	5,13±0,07	1,18	-1,29±0,42
<i>nodA</i>	psfHH103d_126/NB8	-1,35	-1,23±0,5	-3,60	-1,88±0,28
	psfHH103d_208/NB1 7	9,31	4,38±0,01	-1,51	-1,26±0,17
	psfHH103d_257/NB1 5	4,54	3,27±0,17	-2,05	1,11±0,21
	psfHH103d_373/NB1	9,25	11,64±5,58	-1,52	-1,17±0,01
<i>mucR2</i>	psfHH103d_391	3,46	8,68±4,05	2,16	2,54±0,14
	psfHH103d_448/NB1 3	7,11	4,54±0,44	-1,31	1,47±0,16
	psfHH103d_604	-11,25	-5,56±2,16	-14,04	-9,48±7,59
<i>fliG</i>	SFHH103_00308	8,04	10,26±5,69	13,75	4,41±1,25
<i>rem</i>	SFHH103_00335	5,16	18,02±1,74	10,33	4,29±0,06
<i>fbpA</i>	SFHH103_00387	-70,28	-111,75±26,23	-38,44	-18,51±1,54
<i>exoR</i>	SFHH103_01240	-4,56	-3,28±1,45	-4,59	-3,92±0,08
<i>ftsZ1</i>	SFHH103_02000	4,80	4,98±0,33	1,67	2,60±0,18

<i>ptsN</i>	SFHH103_02172	9,89	40,62±9,17	6,18	17,57±1,52
	SFHH103_02569	51,34	45,0±17,24	25,69	70,65±7,32
	SFHH103_03584	106,74	124,51±1,29	28,68	503,2±41,76
<i>exoA</i>	SFHH103_05376	-2,0	-2,53±1,19	-4,09	-2,46±0,19
<i>exoK</i>	SFHH103_05378	-2,82	-3,03±0,46	-4,13	-2,60±0,1
<i>exoY2</i>	SFHH103_05384	-11,91	-4,35±0,38	-8,78	-3,90±0,97
	SFHH103_06390	35,51	23,95±5,25	14,13	11,89±0,5

2.9.1. Genes dependientes de MucR1 en ausencia de genisteína

En ausencia de genisteína, el número de genes sobre-expresados y reprimidos en el mutante $\Delta mucR1$ de *S. fredii* HH103 en comparación con la estirpe silvestre fue de 227 y 166 respectivamente. Muchos de los genes afectados (174 de 393) codifican proteínas hipotéticas, incluyendo dos de los genes que mostraron los mayores cambios de expresión (SFHH103_03584 y 06391, +106,7 y +98,2 respectivamente). Al menos 20 reguladores transcripcionales mostraron una expresión diferencial en ausencia de *mucR1* en comparación con la estirpe parental, por lo que muy probablemente parte de los DEG detectados podrían no estar controlados directamente por MucR1. Entre estos reguladores destaca la presencia de un regulador transcripcional de tipo Crp/FixK (psfHH103d_604, *fold change* -11,3).

Otros reguladores transcripcionales interesantes que se encontraron como DEG fueron miembros de sistemas de dos componentes relacionados con la quimiotaxis, como los genes *cheY1* y *cheY2*, o *feuP*. Otro hecho interesante fue que dos de los genes que mostraron los niveles más altos de represión en $\Delta mucR1$ fueron los genes *hmuS* (que codifica una proteína transportadora/degradadora de hemina, *fold change* -13,5) y *fbpA* (proteína periplásmica inducida por deficiencia de hierro, -70,3), lo que sugiere que MucR1 podría tener un papel en la regulación de la captación de hierro.

2.9.1.1. Genes relacionados con la síntesis de polisacáridos superficiales

Con respecto a los genes relacionados con la síntesis de los polisacáridos superficiales, inesperadamente, la mayoría de los genes *exo* no mostraron cambios significativos en su expresión en ausencia de MucR1. Este es el caso de los genes que codifican glicosil

transferasas involucradas en la síntesis de la subunidad estructural del EPS, como *exoA*, *exoL*, *exoM* o *exoO*, (*fold changes* de -2, -2,1, -1,2, y 1,6 respectivamente) o *exoN* o *exoB*, responsables de la producción de UDP-Glucosa (UDP-Glc) y UDP-Galactosa (UDP-Gal) respectivamente (-2,8 y -1,9). En su lugar, los genes *exoY2* y *exoF1*, responsables de la adición del primer residuo de azúcar (UDP-Gal) al lípido transportador localizado en la membrana interna, y *exoQ*, cuyo producto está involucrado en la polimerización del EPS, aparecían más fuertemente reprimidos (-11,9, -5 y -4,1 respectivamente). Es de destacar que estos tres genes constituyen un operón (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014). Sorprendentemente, el gen *exoR*, cuyo producto es un represor de los genes *exo*, también se encontraba reprimido (-4,5) en el fondo $\Delta mucR1$.

Otros genes relacionados con componentes superficiales que estaban reprimidos en el mutante $\Delta mucR1$ fueron *lpxC*, que codifica una UDP-3-O-acil-N-acetilglucosamina deacetilasa involucrada en la biosíntesis del lípido A, *ndvA* involucrado en el transporte de GC desde el citoplasma al periplasma, y SFHH103_01577, el cual codifica una proteína que modifica los GC y que contiene un dominio MdoB característico de fosfoglicerol transferasas (*fold change* de -3,9, -5, y -6,2, respectivamente). Aunque no se han detectado diferencias entre los patrones electroforéticos del LPS de *S. fredii* HH103 y su derivado $\Delta mucR1$, no se puede descartar la posibilidad de que la ausencia de MucR1 pueda provocar cambios en el LPS no detectables mediante PAGE. Con respecto a los GC, el sobrenadante del mutante en el gen *mucR1* mostró grandes cantidades de GC extracelular en comparación con la estirpe parental. El hecho de que *ndvA* y SFHH103_01577 (cuyo producto es una posible fosfoglicerol transferasa) estén reprimidos en el mutante $\Delta mucR1$ de HH103 podría estar relacionado con este aumento de secreción de GC al medio. Cabe destacar que otro de los reguladores implicados en el transporte de los GC en condiciones de baja osmolaridad, *feuP*, aparece reprimido en el mutante $\Delta mucR1$ (*fold change* -5,4).

2.9.1.2. Genes involucrados en movilidad y quimiotaxis

En relación a los genes que mostraron una sobre-expresión en el mutante $\Delta mucR1$ en ausencia de genisteína, merece la pena mencionar la presencia de un gran grupo relacionado con quimiotaxis y movilidad. Entre las proteínas sobre-expresadas en HH103 $\Delta mucR1$ relacionadas con la quimiotaxis, aparece un sistema de dos

componentes, CheY1 y CheY2 (*fold changes* de +11,1 y +7,3), la proteína de transducción de señal quimiotáctica CheW1 (+9,5), la metiltransferasa CheR (+6,3), y el presunto factor regulador anti-sigma CheX (+5,4). Con respecto a los genes relacionados con la síntesis del flagelo y su funcionamiento movilidad, como diferentes genes *fli*, *flg*, *fla* (*flaB* y *flaC* entre ellos), y *mot*, estaban sobre-expresados en el mutante $\Delta mucR1$. Estos resultados nos llevaron a investigar si las movilidades *swimming* y en superficie pudieran estar afectadas por la mutación en *mucR1*. Sorprendentemente, ni la movilidad *swimming* ($13,1 \pm 0,6$ mm en HH103 $\Delta mucR1$ versus $13,5 \pm 0,7$ mm en HH103 después de 72 horas de incubación) ni la movilidad en superficie ($14,0 \pm 7,2$ mm versus $12,5 \pm 4,0$ mm después de 72 horas de incubación) se vieron significativamente afectadas en el mutante $\Delta mucR1$ bajo nuestras condiciones experimentales.

2.9.1.3. Genes pertenecientes al regulón *nod*

Interesantemente, muchos genes localizados en el plásmido simbiótico y cuya expresión es dependiente de NodD1 y genisteína debido a que están regulados mediante cajas *nod* (*nod*-boxes, NB) (Vinardell *et al.*, 2015, Pérez-Montaña *et al.*, 2016) están sobre-expresados (*fold change* >3,5) en el mutante $\Delta mucR1$ en ausencia de flavonoides (**Tabla 17**): psfHH103d_373, _372 (NB1, posiblemente involucrados en la síntesis de hopanoides, *fold-changes* +9,2 and +8,5), psfHH103d_118, _116 (NB9, proteínas hipotéticas, +4,9 and +3,5), psfHH103d_448, _447 (NB13, proteínas hipotéticas, +7,1 and +4,0), psfHH103d_229, _228, _225 (NB14, proteínas hipotéticas posiblemente involucradas en transferencia de electrones a la nitrogenasa, +8,1 a +4,5), psfHH103d_257 (NB15, histidinol-fosfato aminotransferasa involucrada en la producción de ácido indolacético, +4,8), psfHH103d_208 (NB17, hipotético transportador ABC, +9.3). Además, dos genes cuya expresión es dependiente de *tts* boxes están sobre-expresados en el fondo $\Delta mucR1$ en ausencia de genisteína: un componente del sistema de secreción de tipo 3 simbiótico (psfHH103d_335; TB8, NopX, +4,0) y uno de los efectores secretados a través de este aparato (psfHH103d_349, TB11, NopP, +3,9). Ya que el papel de la mayoría de estas proteínas está por dilucidar, es difícil entender en estos momentos el significado biológico de su regulación por MucR1.

2.9.2. La presencia de la genisteína incrementa el número de DEG en $\Delta mucR1$ de HH103

En presencia de genisteína el número de DEG en el mutante $\Delta mucR1$ fue de 904. El hecho de que el número de genes sobre-expresados y reprimidos fuera 615 y 289 respectivamente, indica que MucR1 actúa principalmente como un represor. Como se mencionó anteriormente, 285 genes se expresan diferencialmente en el mutante $\Delta mucR1$ tanto en ausencia como en presencia de genisteína. El *Dataset 6* contiene la lista de estos genes, así como sus *fold changes* en el mutante $\Delta mucR1$ en ambas condiciones (ausencia o presencia de genisteína). Para todos estos 265 genes, el signo (positivo o negativo) de su expresión diferencial es el mismo en ambas condiciones.

2.9.2.1. Genes relacionados con la producción de polisacáridos superficiales, movilidad y quimiotaxis

En presencia de genisteína, también se afectaron los genes relacionados con la producción de EPS y la de GC aniónicos periplásmicos, la formación del flagelo y quimiotaxis. Diversos genes *exo* (*exoA*, *exoL*, *exoK*, *exoU*, *exoB*, cuyos *fold changes* varían entre -3,6 y -4,3) aparecieron como reprimidos en el mutante *mucR1* en presencia de genisteína, mientras que en ausencia de genisteína se encontraban ligeramente reprimidos (con un rango entre -2 y -2,8). Con respecto a los genes relacionados con la movilidad, merece la pena mencionar que el gen *flgA* (que codifica para una posible chaperona periplásmica que asiste en la formación del anillo P del flagelo) estaba 111,0 veces sobre-expresada en el mutante *mucR1* en comparación con la estirpe silvestre en presencia de genisteína, mientras que en ausencia del flavonoide el *fold change* era sólo de +2,8. Sin embargo, esta diferencia podría ser debida a una sobre-estimación debido al hecho de que la transcripción de este gen fue muy baja en la estirpe silvestre en ausencia de genisteína pero no se detectó en absoluto en presencia del flavonoide. Otros genes relacionados con la movilidad que estaban más sobre-expresados en el mutante $\Delta mucR1$ en presencia del flavonoide eran *fliL* (proteína flagelar transmembrana, +7,3 *versus* +2,3), y dos genes que codifican proteínas del motor flagelar: *motB* (+17,2 *versus* +2,9) y *motC* (+15,2 *versus* +3,1). Cabe destacar que en presencia de genisteína estos tres genes están reprimidos en la cepa silvestre (*fold changes* -2,9, -2,6 y -2,0, respectivamente), lo que sugiere una compleja regulación de los genes relacionados con motilidad en *S. fredii* HH103.

2.9.2.2. Genes pertenecientes al regulón *nod*

La mayoría de los genes dependientes de NB no están incluidos en la lista de DEG en presencia de genisteína, lo que indica que cuando NodD1 se activa con flavonoides el efecto represor de MucR1 sobre estos genes es menos pronunciado (**Tabla 17**). Curiosamente, en presencia de genisteína, el gen *nodA* está reprimido en el mutante ΔmucR1 (*fold change* -3,6). Para analizar más en profundidad estos resultados, se introdujo en HH103 y ΔmucR1 el plásmido pMP240, el cual contiene una copia del gen *lacZ* sin promotor fusionado con el promotor de *nodA* de *R. leguminosarum* (de Maagd *et al.*, 1988). En presencia de genisteína, la actividad β -galactosidasa (en unidades Miller) de ΔmucR1 (pMP240) fue significativamente menor que en HH103 (pMP240) (7.298 ± 3.306 versus 23.345 ± 3.977), confirmando que la ausencia de MucR1 tiene un impacto negativo sobre la expresión de *nodA* en *S. fredii* HH103. Hay que resaltar que *nodZ*, que está también involucrado en la síntesis de NF, está reprimido (*fold change* -3,3) en el fondo ΔmucR1 en presencia de genisteína (**Tabla 17**).

Para intentar comprender mejor la conexión entre MucR1 y el regulón *nod* de HH103, se buscaron las posibles secuencias MucR o RosR *boxes* definidas en *S. meliloti* y *R. leguminosarum* (referencias de los artículos donde se definen) en las regiones promotoras de todos los genes que poseen *nod boxes*. Esta búsqueda se llevó a cabo con el programa *fuzznuc* de la plataforma EMBOSS (Rice *et al.*, 2000) sin detectarse MucR- o RosR *boxes* asociadas a *nod boxes* en *S. fredii* HH103.

2.9.2.3. Genes relacionados con el transporte de iones inorgánicos

Como han descrito recientemente Jiao y colaboradores (2016) en la estirpe CCBAU45436 de *S. fredii*, el defecto simbiótico del mutante ΔmucR1 de *S. fredii* HH103 con soja podría ser debido a la represión de varios transportadores de iones presentes en los bacteroides. En nuestro caso, ninguno de los transportadores estudiados por Jiao *et al.* (2016) se indujo por flavonoides en la estirpe silvestre, y sólo algunos estaban afectados en el mutante *mucR1*. En ausencia de genisteína, *ssuAC* y *tauB* (involucrados en transporte de sulfonatos alifáticos y aminoetanos) estaban sobre-expresados (*fold changes* de +7,3, +4, y +3,5) en el mutante ΔmucR1 . En presencia de genisteína, *modA* y *modC* (relacionados con el transporte de molibdeno) estaban, sorprendentemente,

reprimidos (-4,8) e inducido (+4,7) respectivamente en $\Delta mucR1$ de HH103, mientras que *phoC* (transportador de fosfato) estaba inducido (+4,3).

Tabla17. Efecto de la inactivación de *mucR1* sobre la expresión del regulon *nod* en ausencia y presencia de genisteína.

NB ^a	Locus-tag (nombre del gen)	Descripción	Fold change ^b	
			Sin genisteína	Con genisteína
NB1	psfHH103d_373	Proteína hipotética (posible esteroide Delta-isomerasa)	+9.2	-1.5
	psfHH103d_372	Escualeno/fitoeno sintasa	+8.5	-1.2
	psfHH103d_371_5 (<i>hpnD</i>)	Posible escualeno/fitoeno sintasa	+2.6	+1.3
	psfHH103d_371	Flavoproteína-oxidorreductasa	+2.2	+1.7
	psfHH103d_370 (<i>shc</i>)	Escualeno-hopeno ciclasa	+1.8	+1.3
NB2	psfHH103d_381 (<i>nodZ</i>)	Fucosil transferasa de NF	-3.0	-3.3
	psfHH103d_380 (<i>noeL</i>)	GDP-D-manosa deshidratasa (involucrada en la síntesis de GDP-L-fructosa para la decoración de NF)	+1.1	-1.5
	psfHH103d_379 (<i>noIK</i>)	Nucleótido azúcar epimerasa/dehidrogenasa NAD-dependiente (involucrada en la síntesis de GDP-L-fucosa para la decoración de NF)	+1.6	+1.1
NB3	psfHH103d_384	Proteína hipotética	+3.0	+1.3
NB8	psfHH103d_126 (<i>nodA</i>)	Acil-transferasa de NF	-1.3	-3.6
	psfHH103d_127 (<i>nodB</i>)	Deacetilasa de NF	-1.1	-2.5
	psfHH103d_128 (<i>nodC</i>)	Sintetasa del esqueleto de NF	-1.2	-1.4
	psfHH103d_129 (<i>nodI</i>)	Proteína de transporte de NF dependiente de ATP	+1.2	+1.0

NB8	psfHH103d_130 (<i>nodJ</i>)	Permeasa transportadora de NF de tipo ABC	+1.0	+1.0
	psfHH103d_131 (<i>noI</i> O')	Carbamoil transferase de NF (truncada)	+1.6	+1.3
	psfHH103d_132 (<i>noel</i>)	Metilasa de fucosa de NF	+1.6	+1.5
NB9	psfHH103d_118	Proteína hipotética conservada	+4.9	+1.2
	psfHH103d_116	Proteína hipotética (posible deshidrogenasa)	+3.5	+1.4
NB10	psfHH103d_161 (<i>psiB</i>)	Proteína hipotética conservada (¿inhibición de EPS?)	+3.1	-1.7
NB13	psfHH103d_448	Proteína hipotética que contiene dominio REC	+7.1	-1.3
	psfHH103d_447	Proteína hipotética conservada	+4.0	+1.6
NB14	psfHH103d_229	Posible proteína accesoria hierro-azufre de ensamblaje	+8.1	-1.4
	psfHH103d_228	Proteína hipotética	+6.1	-1.4
	psfHH103d_227 (<i>fixA</i>)	Flavoproteína de transferencia electrónica, subunidad beta	+2.2	-1.6
	psfHH103d_226 (<i>fixB</i>)	Flavoproteína de transferencia electrónica, subunidad alfa	+2.4	-1.9
	psfHH103d_225 (<i>fixC</i>)	Oxido-reductasa	+4.5	-1.2
	psfHH103d_224 (<i>fixX</i>)	Proteína de tipo ferredoxina	+3.1	-1.2
NB15	psfHH103d_257 (<i>y4wE</i>)	Biosíntesis de ácido indol acético (AIA)	+4.8	-2.1

^aSegún Vinardell *et al.*, 2015

^b*Fold change* del mutante *mucR1* versus HH103

3. Discusión

Como se ha comentado anteriormente, *S. fredii* HH103 porta dos copias del gen *mucR*, *mucR1*, que se encuentra en el cromosoma, y *mucR2*, localizada en el plásmido simbiótico. Estudios recientes sugieren que esta segunda copia presente en estirpes de *S. fredii* puede haber sido adquirida mediante transferencia horizontal, ya que *mucR2* siempre se localiza en el plásmido simbiótico en las estirpes de *Sinorhizobium* y además rodeado de secuencias altamente conservadas incluyendo una transposasa (Jiao *et al.*, 2016). El gen *mucR* se encuentra ampliamente distribuido en varias especies tanto rizobianas (en los géneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*) como no rizobianas. El análisis de la secuencia aminoacídica de MucR1 y MucR2 de *S. fredii* HH103 ha permitido revelar que presentan un 100% de identidad con las correspondientes proteínas de *S. fredii* CCBAU45436, mientras que con las de *S. fredii* NGR234 esos porcentajes bajan al 99% y 84%, respectivamente. En muchas estirpes de *S. fredii*, entre ellas CCBAU45436 y HH103, la proteína MucR2 muy probablemente no es funcional debido a un cambio de pauta de lectura (inserción de un nucleótido) en la secuencia nucleotídica de su gen codificante cuando se compara su secuencia con la del gen *mucR2* de otras estirpes de *S. fredii*, incluyendo NGR234. Aunque dicho cambio afecta sólo a los últimos 30 residuos de la proteína, puede provocar la no formación de dos dominios necesarios para la unión de la proteína al ADN (Baglivo *et al.*, 2009; Jiao *et al.*, 2016). En nuestros estudios, el mutante *mucR2* de HH103 no mostró diferencias con la estirpe silvestre en todos los fenotipos estudiados, ya sea en viada libre o en simbiosis con soja. El hecho que no se hayan realizado estudios de MucR2 en las estirpes que no contienen dicha inserción impide saber si dicha proteína desempeña algún papel regulador en dichas bacterias.

Al igual que ocurre en otros rizobios (Janczarek, 2011), en *S. fredii* HH103 MucR1 interviene en la regulación de la producción de EPS. Como se observa en la **Figura 41**, los distintos mutantes de

S. fredii HH103 en *mucR1* ensayados presentaron un aspecto rugoso en placas de YMA, en contraste al aspecto mucoso del silvestre, del mutante en el gen *mucR2* y de la versión complementada de Δ *mucR1*. La cuantificación de equivalentes de glucosa en medio líquido ratificó que la rugosidad de los mutantes *mucR1* en medio YMA se debía

a una reducción de la cantidad de EPS producida, mostrando el mutante $\Delta mucR1$ una disminución del 79% en esta medida (Sección 2.3). Los estudios de H-RMN de los polisacáridos presentes en los sobrenadantes de cultivos líquidos confirmaron que la falta de MucR1 origina una reducción drástica en la cantidad de EPS presente, y mostraron que dicha ausencia no produce cambios en la estructura de este polisacárido (**Figura 42**). En todos estos experimentos la complementación de la mutación en *mucR1* restauró el fenotipo de la estirpe silvestre, lo que confirmó que MucR1 en *S. fredii* HH103 es un regulador positivo de la producción de EPS, hecho que está en consonancia con los resultados obtenidos anteriormente en *S. meliloti* 1021, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* Rt24.2 y *S. fredii* CCBAU45436 (Revisado en Janczarek, 2011; Jiao *et al.*, 2016). Al igual que ocurre en la estirpe *S. fredii* CCBAU45436 (Jiao *et al.*, 2016), MucR2 de *S. fredii* HH103 no interviene en la producción de EPS.

La cantidad de *biofilm* formado por el mutante $\Delta mucR1$ fue superior en comparación con la cepa silvestre y con la estirpe complementada (**Figura 43**). Este resultado fue sorprendente, ya que en trabajos anteriores se ha demostrado que el EPS es un factor importante para la formación de *biofilm* en *S. fredii* HH103 (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014, capítulo X de esta tesis). Además, la estructura del *biofilm* formada por el mutante $\Delta mucR1$ se corresponde con la formación de un agregado de células que se localizan en la interfase aire-líquido, al cual se le denomina *pellicle* (**Figura 44, 45 y 46**). El *pellicle* es una estructura formada por varias especies de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Su formación se lleva a cabo en varias fases en las que la producción de una matriz extracelular es esencial y donde los genes de movilidad también realizan un papel importante en muchas de las bacterias estudiadas. La formación de esta estructura, por parte de algunas bacterias, en la interfase aire-líquido puede suponer un ambiente favorable, sobre todo para los microorganismos aerobios, ya que disponen de una alta concentración de oxígeno además de nutrientes proporcionados por el medio de cultivo (Hölscher *et al.*, 2015). Todos los organismos capaces de formar el *pellicle* a menudo comparten 3 características para su formación: su formación se dispara por el oxígeno, la movilidad flagelar suele ser esencial y todas las especies estudiadas usan una matriz que en la mayoría de los casos es de celulosa, aunque se han descrito otros polisacáridos (Armitano *et al.*, 2014).

Otro de los efectos descritos en un mutante *rosR* de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* es un aumento de la capacidad de auto-agregación de la bacteria (Rachwal *et al.*, 2015). En nuestro trabajo también hemos observado que la inactivación del gen *mucR1* provocó un aumento en dicha capacidad (entre un 76 y un 90%), mientras que la estirpe parental y la complementada mostraron niveles casi nulos de auto-agregación. Parte de este aumento puede deberse a la drástica disminución en la producción de EPS, ya que un mutante en el gen *exoA* también mostró aumento en su capacidad de auto-agregación. Sin embargo, este mutante no alcanza los niveles de auto-agregación de los mutantes *mucR1*, lo que sugiere que MucR1 afecta a más de un factor relacionado con la auto-agregación.

La inactivación del gen *rosR* en *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, además de provocar alteraciones en la producción de EPS, da lugar a una modificación en la composición del antígeno-O del LPS (Janczarek *et al.*, 2010). Por ello, se decidió investigar si la inactivación de *mucR1* en *S. fredii* HH103 podría tener algún efecto sobre la producción de otros polisacáridos. A partir de los resultados obtenidos mediante nuestras técnicas, ninguno de los polisacáridos investigados (LPS, KPS y GC intracelulares) se vio afectado por la falta de *mucR1* y/o *mucR2* según los análisis realizados (**Figura 48**), lo que podría ser otro ejemplo de cómo diferentes rizobios pueden regular la producción de sus polisacáridos superficiales de distinta manera. Sin embargo, el análisis de los polisacáridos extracelulares del mutante Δ *mucR1*, además de revelar la drástica disminución en la cantidad de EPS, mostró un aumento de la producción de GC extracelulares en comparación con la estirpe silvestre y con la complementada (**Figura 49**). Este fenómeno podría deberse a otros genes regulados por MucR1 o ser consecuencia de la disminución de la cantidad de EPS producido, de tal modo que los azúcares no usados para su síntesis podrían ser desviados para la producción de otros polisacáridos como los GC extracelulares. Para investigarlo, se analizó el sobrenadante del mutante *exoA* de *S. fredii* HH103, deficiente en la producción de EPS y se encontró un aumento similar en la cantidad de GC extracelulares al observado en la estirpe Δ *mucR1* (**Figura 49**). Este hecho claramente sugiere una interconexión entre la síntesis de ambos polisacáridos. El estudio de otras condiciones que provocan una disminución en la producción de EPS en *S. fredii* HH103, como la presencia de genisteína o la ausencia

del gen regulador *nolR* (ver Capítulo 3; Acosta-Jurado *et al.*, 2016b), podrían aportar más luz a esta cuestión.

Diversos trabajos muestran que la inactivación de ortólogos de *mucR* en varios rizobios provoca diferentes efectos sobre la simbiosis dependiendo de la planta hospedadora (Keller *et al.*, 1995; Janczarek *et al.*, 2009, 2010). Un mutante *mucR* de *S. meliloti* no está afectado en su capacidad simbiótica con *Medicago*, mientras que la inactivación del ortólogo de *mucR* en *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (*rosR*) da lugar a una disminución significativa en el número de nódulos y en la fijación en plantas de *Trifolium*. En este trabajo hemos investigado el efecto de la inactivación de *mucR1* en *S. fredii* HH103 en su interacción en dos plantas hospedadoras: *G. max* (la variedad americana Williams) y *L. burttii* (Margaret *et al.*, 2011; Sandal *et al.*, 2012). Cabe destacar que *S. fredii* HH103 infecta estas dos plantas mediante diferentes mecanismos: tubos de infección en soja y *crack-entry* en *L. burttii* (Margaret *et al.*, 2011; Acosta-Jurado *et al.*, 2016a). Como se ha descrito en la sección 2.7, las estirpes con el gen *mucR1* inactivado presentaron una deficiencia severa en ambas plantas. Sin embargo, el número de nódulos producido por el mutante Δ *mucR1* en soja fue significativamente mayor en soja (**Tabla 13**), pero significativamente menor en *L. burttii* en comparación con los nódulos producidos por la estirpe parental (**Tabla 14**). Además, los nódulos formados en plantas de soja mostraron una eficiencia fijadora muy inferior a las de la estirpe parental ($309 \pm 20,2$ versus $3424,7 \pm 971,2$ nmoles de etileno por planta por hora). En plantas de *L. burttii* también se dio dicha reducción, pero no fue tan acusada como en soja ($95,0 \pm 27,7$ versus $295,6 \pm 80,8$). En *S. fredii* CCBAU45436 también se ha estudiado el efecto simbiótico de la inactivación de los genes *mucR1* y *mucR2* con *G. max* JD17. Al igual que ocurre en *S. fredii* HH103, el mutante *mucR1* provoca un aumento de la cantidad de nódulos y al mismo tiempo una deficiencia en la fijación de nitrógeno, mientras que el mutante *mucR2* no mostró ninguna diferencia con la estirpe parental (Jiao *et al.*, 2016). Estos resultados demuestran que *mucR1* es esencial para la simbiosis de *S. fredii* con *G. max*, tanto en una variedad americana (Williams) como en una asiática (JD17) y, además, es importante para la simbiosis con otra leguminosa, *L. burttii*, aunque con un fenotipo diferente al mostrado con soja, pero similar al descrito en la interacción del mutante *rosR* de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* con *Trifolium* (Janczarek *et al.*, 2010). Aunque este

hecho requiere más estudio, es intrigante que el número de nódulos inducido por HH103 $\Delta mucR1$ se afecte de distinta manera en dos plantas hospedadoras distintas y podría sugerir que las señales simbióticas afectadas por la mutación participen en distinto momento en cada interacción simbiótica o que señales moleculares que son importantes en una interacción tienen menor relevancia en otras interacciones. Una posible hipótesis puede ser que la reducción de la expresión de los genes de nodulación provoque la reducción del número de nódulos en el caso de *L. burttii*, ya que el modo de infección mediante crack entry de HH103 es dependiente de NF. Por otro lado, el aumento del número de nódulos, aunque ineficientes, en simbiosis con soja puede deberse a que en esta planta el defecto no sea en infección sino a la deficiencia en el proceso de fijación de nitrógeno debido a la represión de transportadores de iones como ocurre en la estirpe CCBAU45436, de modo que la planta permita un mayor número de nódulos debido al hambre de nitrógeno. De hecho, en el caso de esta estirpe (Jiao et al., 2016) la mutación de algunos de los genes codificantes de estos transportadores, como el de fosfato de alta afinidad *pstSCAB* o el sistema de transporte de zinc codificado por *znuABC*, provoca un fenotipo similar que el provocado por la mutación de *mucR1*.

Al igual que se ha descrito en *S. meliloti* y en *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Janczarek y Skorupska, 2007; Keller et al., 1995), *MucR1* de *S. fredii* HH103 regula su propia expresión uniéndose a su región promotora (**Figura 51**). Sin embargo, en nuestros estudios no hemos sido capaces de identificar a qué secuencia de ADN concreta se une esta proteína. Sorprendentemente, *MucR1* no se une a una *MucR-box* bien conservada, tal y como se definió para el promotor de *mucR* de *S. meliloti* 1021, presente en su zona promotora. Resultados similares se obtuvieron en *S. meliloti* 1021, donde *MucR* regula la expresión de *exoH* y *exoY*, y para ello se une a sus regiones promotoras a pesar de que estas carecen de *MucR-box* bien conservadas (Bertram-Drogatz et al., 1997, 1998).

Recientemente, se han publicado estudios transcriptómicos del efecto de la ausencia de *MucR*/*RosR* en *S. fredii* CCBAU45436 y *R. leguminosarum* bv. *trifolii* Rt24.2 (Jiao et al., 2016; Rachwall et al., 2015). En *R. leguminosarum* bv. *trifolii* se expresaron diferencialmente 1106 genes en células de vida libre del mutante *rosR* en comparación con la estirpe silvestre (valores del $\log_2 > 2$ del mutante/silvestre). En *S. fredii* CCBAU45436, los números de genes expresados diferencialmente (DEG) en el mutante

mucR1 en comparación con la estirpe silvestre ($\log_2 \text{mut/silvestre} > 1$) eran 621 y 597 en células de vida libre y bacteroides aislados de nódulos de soja respectivamente. Como se mencionó en la sección 2.9, los números de DEG encontrados en el mutante ΔmucR1 de *S. fredii* HH103 fueron 393 en ausencia y 904 en presencia de genisteína. Todos estos estudios confirman que *mucR* es un regulador global que afecta la expresión de cientos de genes en todas las especies rizobianas estudiadas, ya sea directamente o a través de la modulación de la expresión de otros reguladores transcripcionales. De hecho, en *S. fredii* HH103, dentro de los DEG encontrados en ausencia de genisteína destaca la presencia de muchos reguladores transcripcionales de diferentes familias (como GntR y LuxR) tal y como ocurre en el mutante *rosR* de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Entre ellos se encuentran genes que intervienen en quimiotaxis (*cheY1* y *cheY2*), metabolismo de hierro (*fbpA*, *hmuS*) e incluso reguladores que controlan la expresión de genes inducibles en condiciones anóxicas, microóxicas, endosimbióticas y fijadoras de nitrógeno como ocurre con el regulador de tipo Crp/FixK (psfHH103d_604) (Mesa *et al.*, 2008).

En todas los rizobios estudiados, incluyendo *S. fredii* CCBAU45436 y HH103, MucR es un regulador positivo de la producción de EPS (Janczarek, 2011; Jiao *et al.*, 2016). Debido a ello y a que MucR1 es un regulador transcripcional, podría esperarse que los genes que intervienen en la síntesis del EPS estuviesen diferencialmente expresados en HH103 ΔmucR1 . Sin embargo, con la excepción de *exoY2*, *exoF1*, *exoQ* (reprimidos fuertemente en el mutante), la mayoría de genes *exo* sólo se afectaron ligeramente. Este hecho se repite en el mutante *rosR* de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Rachwal *et al.*, 2015), donde los genes de producción de EPS muestran cambios leves en su expresión en comparación con la estirpe parental. Los resultados obtenidos en esta Tesis están en consonancia con estudios realizados en *S. meliloti* en los que se observó que MucR prácticamente no afecta el nivel de expresión de los genes *exo*, con excepción de *exoY*, *exoF* y *exoQ*, a los que induce notablemente (Keller *et al.*, 1995). Por tanto, parece que, al menos en *Sinorhizobium*, el efecto positivo de MucR sobre la producción de EPS se debe a la inducción de la expresión de las proteínas responsables de la adición del primer azúcar al lípido transportador (ExoY y ExoF) así como de una proteína transmembrana que interviene en la polimerización de este polisacárido (ExoQ). En cuanto al aumento en la producción de GC extracelulares observada en el mutante ΔmucR1 , aunque nuestro

trabajo sugiere que está relacionado con la drástica disminución en la producción de EPS, en este momento desconocemos cómo se produce dado que no existe información sobre cómo se secretan los GC al medio. Curiosamente, existen dos genes relacionados con la producción de GC que aparecen reprimidos en el mutante $\Delta mucR1$: *ndvA*, que codifica una proteína de la membrana plasmática responsable del transporte de los GC periplásmicos, y SFHH103_01577, cuyo producto es una proteína responsable de la adición de residuos de fosfoglicerol a los GC. Dado que, al menos en *S. meliloti*, los GC extracelulares son predominantemente neutros (Geiger *et al.*, 1991), creemos que la disminución en la expresión de *ndvA* y SFHH103_01577 que tiene lugar en *S. fredii* HH103 $\Delta mucR1$ está relacionada de algún modo con el incremento en la secreción de GC al exterior observado en este mutante. Otro dato a tener en cuenta es que uno de los genes que aparecen reprimidos en el fondo $\Delta mucR1$ es el gen *feuP* (-5,4), regulador transcripcional que en *S. meliloti* controla la expresión de al menos 16 genes (incluyendo *ndvA*) en respuesta a condiciones de baja osmolaridad (Griffitts *et al.*, 2008). En *S. fredii* HH103, además de *ndvA*, hemos encontrado 7 ortólogos más de los genes controlados por *feuP* en *S. meliloti*, y todos ellos se encuentran reprimidos en el mutante $\Delta mucR1$: SFHH103_00611 (-5,8, ortólogo de SMb20838), SFHH103_00710 (-4,7, SMc00065), SFHH103_00740 (-5,2, SMc02389), SFHH103_01338 (-8,4, SMc00252), SFHH103_01771 (-5,8, SMc04336), SFHH103_02119 (-5,2, SMc01557), and SFHH103_02145 (-11,0, SMc01586). Por todo ello es muy probable que en la estirpe silvestre MucR1 controle la expresión de todos estos genes a través de la activación de la expresión de FeuP.

Una de las diferencias obtenidas en los datos transcriptómicos obtenidos en este trabajo cuando se comparan con los del mutante *rosR* de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* es la inducción de una gran cantidad de genes relacionados con la quimiotaxis y movilidad en HH103 $\Delta mucR1$, mientras que en *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, RosR regula positivamente estos genes y como consecuencia la movilidad bacteriana (Rachwal *et al.*, 2015). Sin embargo, nuestros datos sí están en consonancia con los obtenidos en *S. meliloti*, donde MucR reprime la movilidad bacteriana (Bahlawane *et al.*, 2008). En cualquier caso, a pesar de la mayor expresión de diversos genes de movilidad en el fondo $\Delta mucR1$, la movilidad bacteriana de tipo *swimming* o en superficie de este mutante no fue diferente de la de la estirpe silvestre en nuestras condiciones experimentales, por lo

que se necesita profundizar en este tipo de estudios para entender la relevancia de los cambios observados en dicha expresión génica.

Los genes que se encuentran bajo el control de las cajas de nodulación NB1, NB9, NB13, NB14, NB15 y NB17, así como dos genes relacionados con el T3SS (*nopX* y *nopP*) aparecen sobre-expresados en el fondo $\Delta mucR1$. La aparición de genes pertenecientes al regulón *nod* entre los DEG encontrados en el fondo $\Delta mucR1$ en ausencia de flavonoides revela la complejidad de la regulación de los genes simbióticos de la bacteria y pone de manifiesto de nuevo el hecho de que el papel regulador de MucR1 se extiende a muchos grupos génicos de función diversa. En estos momentos desconocemos cómo MucR1 reprime a esos genes simbióticos y el significado biológico de dicha represión.

En presencia de genisteína aumenta el número de DEG a 904, 2,3 veces más que en ausencia de genisteína. En estas condiciones aparecen genes relacionados con la producción de EPS, producción de GC, formación del flagelo o quimiotaxis, similares a los detectados en ausencia de genisteína, lo que indica que el efecto de MucR1 sobre esos genes no depende de la presencia de flavonoides. Aun así, aparecen reprimidos más genes relacionados con la producción de EPS que en ausencia de genisteína y algunos genes de movilidad poseen una inducción mucho mayor en estas condiciones como *flgA*, *flil* o algunos genes *mot*. Estos resultados indican una regulación compleja de la movilidad de *S. fredii* HH103 en presencia de genisteína, ya que en la estirpe parental estos genes aparecen reprimidos (aproximadamente unas 3 veces) en las mismas condiciones (Pérez-Montaña *et al.*, 2016). En la actualidad nuestro grupo, en colaboración con la Dra. María José Soto (Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada) está estudiando el efecto de la genisteína sobre la movilidad de *S. fredii* HH103.

En presencia de genisteína los genes del regulón *nod* son activados por NodD1, y ninguno de ellos se sobre-expresa en el fondo $\Delta mucR1$ (**Tabla 17**). Este hecho indica que en la estirpe silvestre la represión de MucR1 sobre parte del regulón *nod* observada en ausencia de flavonoides es contrarrestada por la activación llevada a cabo por NodD1 en presencia de estos. Sin embargo, es de destacar el hecho de que en presencia de genisteína la expresión del gen *nodA* disminuye (*fold change* -3,6) en HH103 $\Delta mucR1$. Este hecho puede deberse a que en este fondo la expresión de NodD1 disminuye

ligeramente en presencia de genisteína (-1,5). Este efecto positivo de MucR1 sobre *nodD* y, por lo tanto, sobre la expresión de *nodABC*, se ha descrito previamente en *S. meliloti* (Mueller y González, 2011). Por tanto, nuestros resultados sugieren que MucR1 está interconectado con el regulón *nod* y que es capaz de modular, positiva o negativamente, la expresión de diferentes genes pertenecientes a dicho regulón. Muy probablemente, este hecho está relacionado con el fenotipo simbiótico en el que se da una reducción de la efectividad simbiótica del mutante *S. fredii* HH103 Δ *mucR1* en las dos leguminosas analizadas.

Cabe destacar que ninguna de las agrupaciones génicas de los principales sistemas bacterianos que se encuentran diferencialmente expresados en el RNA-seq (quimiotaxis, EPS, movilidad, regulón *nod*), está bajo la regulación de MucR o RosR *boxes* tal y como se han definido en *S. meliloti* o *R. leguminosarum* (Bertram-Drogatz *et al.*, 1998; Bahlawane *et al.*, 2008; Mueller y González 2011; Rachwal *et al.*, 2015), ya que no se localizó ninguna de estas cajas aguas arriba de cada conjunto génico.

Jiao y colaboradores (2016) han descrito el fenotipo simbiótico del mutante *mucR1* en *S. fredii* CCBAU45436 con la variedad asiática JD17 de soja. Aunque este mutante forma más nódulos que la estirpe silvestre, su capacidad fijadora de nitrógeno es menor y en consecuencia las plantas inoculadas con él presentan pesos secos similares al de las no inoculadas. En los análisis transcriptómicos de los bacteroides del mutante *mucR1* de esta estirpe en soja se encontró que varios transportadores de iones (fosfato, zinc, hierro, molibdeno, azufre) estaban reprimidos. Estos autores obtuvieron mutantes individuales en algunos de esos transportadores, y éstos exhibieron deficiencias simbióticas similares a las del mutante *mucR1*, lo que indica que la disminución en la expresión de dichos transportadores en el mutante *mucR1* justificaba su fenotipo simbiótico. En nuestros estudios con *S. fredii* HH103 Δ *mucR1* no hemos encontrado grandes alteraciones en la expresión de esos transportadores ni en ausencia ni en presencia de genisteína, lo que sugiere que en *S. fredii* MucR1 sólo activa su expresión en el estado de bacteroide, muy probablemente porque son esenciales para la actividad de la nitrogenasa.

En conclusión, nuestro trabajo muestra que en *S. fredii* HH103 MucR es un regulador global que desempeña un importante papel en sus interacciones simbióticas como

ocurre en la mayoría de rizobios dónde se ha estudiado (Janczarek *et al.*, 2010; Rachwal *et al.*, 2015; Jiao *et al.*, 2016). Analizando toda la información en conjunto puede concluirse que MucR afecta a genes pertenecientes al regulón *nod*, a la síntesis de polisacáridos superficiales, a genes relacionados con movilidad y, al menos en *S. fredii* CCBAU45436, a transportadores de iones importantes para la actividad nitrogenasa de los bacteroides. Sin duda, uno de los aspectos esenciales por estudiar es determinar las secuencias concretas a las que se une esta proteína para llevar a cabo su actividad reguladora, lo que, junto con los datos transcriptómicos obtenidos en diversos rizobios y en diversas condiciones, permitiría entender mejor el conjunto de genes regulados y el papel que MucR desempeña tanto en vida libre como en simbiosis en cada pareja concreta rizobio-leguminosa.

DISCUSIÓN GENERAL

El establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa implica un intercambio de señales moleculares coordinado entre la planta y los rizobios, inicialmente llevada a cabo por la secreción de flavonoides de la planta, y la subsecuente producción de factores de nodulación (NF) como respuesta por parte de la bacteria. Además de los NF y de, en algunos casos, proteínas secretadas, los rizobios poseen diversos polisacáridos superficiales que intervienen en las distintas etapas de la simbiosis (Jones *et al.*, 2007; Gibson *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012; Janczarek, 2015). Entre todos los polisacáridos existentes los más estudiados, en cuanto a su papel en simbiosis, son los glucanos cíclicos (GC), el polisacárido capsular de tipo antígeno K (KPS), el lipopolisacárido (LPS) y el exopolisacárido (EPS) (Frayse *et al.*, 2003).

Históricamente, se han intentado establecer modelos generales para todos los rizobios y plantas en los que se definen la implicación de cada tipo de polisacárido en simbiosis. Un ejemplo es la relevancia del EPS en la simbiosis, para el que se estableció que su papel era más trascendente en las interacciones con plantas formadoras de nódulos de tipo indeterminado que en aquellas que desarrollan nódulos determinados (Frayse *et al.*, 2003). En *S. meliloti* o *R. leguminosarum* los mutantes deficientes en la producción de EPS dan lugar a fenotipos en los que los tubos de infección no se desarrollan o son aberrantes (Rolfe *et al.*, 1996; van Workum *et al.*, 1997; Cheng y Walker *et al.*, 1998). Sin embargo, un mutante carente de EPS (mutante *exoA*) de *S. fredii* HH103 es capaz de llevar a cabo una simbiosis totalmente efectiva tanto en plantas formadoras de nódulos determinados, como soja y *cowpea*, como en leguminosas que forman nódulos indeterminados, como *Glycyrrhiza uralensis* o *Cajanus cajan* (Parada *et al.*, 2006; Margaret-Oliver *et al.*, 2012). Por otro lado, en determinadas estirpes de *S. meliloti*, como Rm41, no es totalmente necesaria la presencia de un EPS intacto. Esta estirpe posee un KPS simbióticamente activo y es capaz de sustituir la función del EPS en el establecimiento de la simbiosis, de modo que basta con que este uno de los dos polisacáridos presentes para que se dé una simbiosis efectiva con *Medicago* (Putnoky *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1990; Reuhs *et al.*, 1995; Pellock *et al.*, 2000). Esta característica tampoco se puede postular como una generalidad, ya que la abolición de la producción de EPS y KPS en *S. fredii* HH103 (doble mutante *rkpH exoA*) no impide el desarrollo de algunos nódulos fijadores tanto en plantas formadoras de nódulos determinados como

en aquellas que forman nódulos indeterminados (Parada *et al.*, 2006; Hidalgo *et al.*, 2008; Margaret-Oliver *et al.*, 2012).

En relación al KPS, las regiones génicas implicadas en la producción de este polisacárido se encuentran bien conservadas entre las estirpes de *S. fredii* y *S. meliloti* (Rm41, AK631 y 1021) y se denominan *rkp-1*, *rkp-2* y *rkp-3*. En anteriores estudios en nuestro grupo de investigación se han caracterizado las regiones *rkp-1* y *rkp-3* en simbiosis con plantas formadoras de nódulos de tipo determinado o indeterminado (Parada *et al.*, 2006; Hidalgo *et al.*, 2008; Margaret-Oliver *et al.*, 2012; Margaret *et al.*, 2012), por lo que en esta tesis se ha completado el estudio de las regiones denominadas *rkp* con la caracterización de la región *rkp-2*.

La región *rkp-1* está compuesta por genes involucrados en el transporte del KPS ya que sus productos son responsables de la síntesis del lípido transportador (Kiss *et al.*, 1997). La mutación de algunos de los genes de esta región abole la producción de KPS y origina claras deficiencias en simbiosis con las plantas testadas, aunque se sigue formando un pequeño número de nódulos fijadores. Ninguno de los mutantes de la región *rkp-1* posee alterado el perfil de LPS a excepción del mutante *rkpU*, cuyas modificaciones en este polisacárido se dan en cultivos en fase estacionaria muy avanzada (5 días) (Parada *et al.*, 2006; Hidalgo *et al.*, 2008; Margaret-Oliver *et al.*, 2012). En el estudio de la simbiosis con dos especies de la leguminosa modelo *Lotus* (*L. burtii* y *L. japonicu* Gifu), se usaron los mutantes en los genes *rkpA* y *rkpU*, pertenecientes a la región *rkp-1*. Estos mutantes fueron totalmente efectivos en esta simbiosis, dando lugar a valores similares a la estirpe parental en los parámetros analizados. Estos resultados permiten concluir que el KPS de *S. fredii* HH103 es más importante en la simbiosis con soja que con *Lotus burtii*, a pesar de que ambas leguminosas forman nódulos de tipo determinado.

Como se ha descrito en el capítulo 1 de esta tesis, la región *rkp-2* está implicada en la producción de ácido glucurónico y galacturónico a través de los productos de sus dos genes *rkpK* y *lpsL*, respectivamente. Ninguno de estos genes está implicado en la producción de KPS, debido a que la estructura del KPS de *S. fredii* HH103 es un homopolímero de un derivado del ácido pseudoamínico (Gil-Serrano *et al.*, 1999) y ninguno de los ácidos producidos por las enzimas codificadas por esta región está presente en su estructura, a diferencia de lo que ocurre en *S. meliloti* AK631, cuyo KPS

contiene ácido glucurónico (Kereszt *et al.*, 1998). Por otro lado, la mutación de cualquiera de estos genes da lugar a alteraciones en el perfil electroforético del LPS, indicando que ambos ácidos urónicos se encuentran formando parte del LPS. En la actualidad nuestro grupo está determinando la estructura del LPS de *S. fredii* HH103 en colaboración con el Dr. Rodríguez-Carvajal (Departamento de Química Orgánica, Universidad de Sevilla) y el Dr. Molinaro (Department of Chemical Sciences, University of Napoli Federico II, Italia). Aunque aún no se conoce la estructura final de este polisacárido, los datos existentes (obtenidos mediante H-RMN y confirmados por espectrometría de masas) apoyan la presencia de ambos ácidos urónicos en el LPS de HH103 (Miguel Ángel Rodríguez Carvajal, comunicación personal). Puesto que el ácido glucurónico es un componente estructural del EPS (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014), la mutación en el gen *rkpK*, afecta la producción de este polisacárido, como ocurre en *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, donde la mutación del gen *exo5* (una UDP-glucosa deshidrogenasa) provoca alteraciones en los polisacáridos que contienen ácido glucurónico (Laus *et al.*, 2004). Sin embargo, hay que destacar que en *S. fredii* la ausencia de glucurónico no da lugar a formas alteradas del EPS, sino que, según los datos obtenidos en esta tesis (rugosidad en placas de YMA, reducción en los equivalentes de glucosa en los sobrenadantes en YM, desaparición de las señales del EPS en espectros de H-RMN), abole su producción. Este es un resultado sorprendente, ya que, típicamente, cuando las mutaciones en los genes *exo* no interrumpen la síntesis de la cadena principal de la subunidad de repetición sino la de las ramificaciones (dónde se ubica el ácido glucurónico), se producen formas alteradas del EPS pero no se abole su producción (Kelly *et al.*, 2013). Estos resultados sugieren que en *S. fredii* HH103 la ausencia de síntesis de unidades de ácido glucurónico imposibilitarían bien que se complete la síntesis de la subunidad de repetición del EPS, bien su transporte al exterior, bien su polimerización.

Por otro lado, el fenotipo simbiótico con soja y *cowpea* difiere entre ambos mutantes de la región *rkp-2*. Así, la eficiencia simbiótica del mutante *rkpK* es similar a la de la estirpe silvestre con soja y con *Lotus burtii*, y sólo muestra una reducción significativa con *cowpea* aunque induce la formación de nódulos fijadores de nitrógeno. En cambio, el mutante *lpsL* sufre graves defectos simbióticos con las tres leguminosas probadas:

desde una total incapacidad con *cowpea* hasta una gran reducción en el número de nódulos fijadores en *L. burttii*, mientras que en soja sólo es capaz de inducir la formación de pseudonódulos no invadidos.

El fenotipo simbiótico del mutante *lpsL* se asemeja al de los mutantes de *S. fredii* HH103 en la región *rkp-3*. Esta región contiene genes que intervienen en la exportación del KPS y en la síntesis del derivado del ácido pseudoamínico presente en el KPS, pero también en la estructura del LPS (datos de H-RMN, Miguel Ángel Rodríguez Carvajal, comunicación personal). Por ello, todos los mutantes de esta región carecen de KPS y presentan alteraciones en el LPS (Margaret *et al.*, 2012). El fenotipo simbiótico de estos mutantes fue muy drástico, ya que sólo indujeron pseudonódulos en soja, *cowpea* y *C. cajan* y mostraron una reducción del número de nódulos y de plantas noduladas con *G. uralensis*. Las alteraciones provocadas por las mutaciones en estos genes también generan defectos en la simbiosis con *L. burttii*, de tal modo que se da lugar a una reducción de los parámetros analizados: número de nódulos y longitud de la parte aérea.

El hecho de que los mutantes en la región *rkp-1*, que no producen KPS, muestren alteraciones simbióticas menos severas que los mutantes de la región *rkp-3* indica que, muy posiblemente, sean las alteraciones en el LPS las causantes de los graves defectos simbióticos mostrados por estos últimos mutantes. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que el fenotipo simbiótico mostrado por un mutante *lpsB* de *S. fredii* HH103 es también muy severo en soja, una drástica reducción del número de nódulos inducidos en soja (donde además se formaron numerosos pseudonódulos), así como senescencia prematura de los pocos nódulos formados (Margaret *et al.*, 2013). El número de nódulos fijadores inducidos por el mutante *lpsB* de *S. fredii* HH103 también se redujo en las simbiosis con *cowpea* y *L. burttii* (Margaret *et al.*, 2013; Acosta-Jurado *et al.* 2016c).

El análisis de los fenotipos simbióticos de los diversos mutantes de *S. fredii* HH103 afectados en la producción de LPS lleva a la conclusión de la enorme importancia de un LPS intacto para la simbiosis de *S. fredii* HH103 con cualquiera de sus plantas hospedadoras. Así, la alteración de dicho polisacárido provoca defectos en simbiosis que pueden llegar desde severos o muy severos, casos del mutante *lpsB* y de los mutantes de la región *rkp-3*, a una simbiosis totalmente inefectiva, incluso sin la presencia de

pseudonódulos, como es el caso del mutante *lpsL* en simbiosis con *cowpea*. Por lo tanto, no sólo interviene la alteración propiamente dicha del LPS en la simbiosis con las leguminosas, sino que en función del tipo de modificación que posea el LPS y en qué región se produzca, el fenotipo simbiótico puede ser más o menos severo. Estos defectos en simbiosis provocados por alteraciones del LPS se producen también en otros rizobios como en *B. elkanii*, donde los mutantes afectados en LPS producen sólo pseudonódulos en sus simbiosis con soja, o en *S. meliloti*, en el que la mutación en el gen *lpsB* hace que no se complete el programa de diferenciación a bacteroide y por lo tanto provoca que se generen nódulos inefectivos en *Medicago* (Puvanesarajah *et al.*, 1987; Stacey *et al.*, 1991; Kannenberg *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 2002).

En cuanto a la regulación de la producción del LPS en *S. fredii* HH103, no se han encontrado condiciones en las que se module la producción del mismo o se altere su perfil electroforético, salvo las mutaciones en los genes implicados en su producción. En el caso de otros rizobios el LPS se puede modificar bajo determinadas condiciones ambientales e incluso por los flavonoides secretados por la planta como ocurre en *S. fredii* NGR234 donde estas moléculas inducen la producción de un nuevo tipo de LPS rico en ramnosa (Theunis *et al.*, 2004; Broughton *et al.*, 2006). Las únicas modificaciones encontradas en el LPS de *S. fredii* HH103 han sido en el estado de bacteroide y en simbiosis con una leguminosa del clado IRLC, *Glycyrrhiza uralensis*, donde sí se produce una alteración del perfil electroforético (Crespo-Rivas *et al.*, 2016).

Además del LPS, otro de los polisacáridos superficiales que parecen ser imprescindibles para la simbiosis de *S. fredii* HH103 con sus hospedadores son los GC. La ausencia de este polisacárido en HH103 provoca la formación de pseudonódulos en plantas de soja y *G. uralensis*, mientras que en *cowpea* sólo se formaron primordios nodulares que no llegaron a desarrollarse en estructuras macroscópicas (Crespo-Rivas *et al.*, 2009). En cuanto a la simbiosis con plantas de *Lotus* (Acosta-Jurado *et al.*, 2016c), este mutante sólo fue capaz de inducir la formación de nódulos inefectivos en *L. burtii*, mientras que en *L. japonicus* Gifu se mantuvo el fenotipo de la estirpe parental (formación de abultamientos de tipo macroscópico). Por tanto, la ausencia de producción de GC en *S. fredii* HH103 lleva a la incapacidad de inducir nódulos efectivos en todas las leguminosas hospedadoras probadas hasta la fecha. Estos resultados están en consonancia con lo

descrito para otros rizobios como *S. meliloti*, *M. loti* o *B. japonicum* (revisado en López-Baena *et al.*, 2016), lo que indica claramente la esencialidad de este polisacárido para la simbiosis. Aunque las razones de esta esencialidad no se han estudiado en profundidad, los datos existentes sugieren que el papel osmoprotector de los GC podría ser clave para la supervivencia de los rizobios en los distintos ambientes por los que transita durante el proceso simbiótico (Breedveld y Miller, 1998; López-Baena *et al.*, 2016).

En contraste con lo que hemos encontrado hasta el momento para el LPS de *S. fredii* HH103, la producción del EPS de esta bacteria posee una regulación compleja. En estudios previos de nuestro laboratorio se describió la existencia de una regulación mediada por flavonoides inductores, de tal modo que la presencia de estas moléculas fenólicas provoca una reducción de la producción del EPS (Vinardell *et al.*, 2004a). Esta regulación parece ser exclusiva de HH103 puesto que no está presente en *S. meliloti* Rm1021 y tampoco en *S. fredii* NGR234. En el caso de *S. meliloti* Rm1021 los flavonoides provocan un aumento en la producción del EPS, al igual que en *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Dusha *et al.*, 1999; Janczarek y Skorupska, 2011). En otra de las estirpes de *S. fredii*, USDA193, se lleva a cabo una regulación del EPS a causa de la presencia de flavonoides, pero en este caso se produce un cambio en el peso molecular el EPS, pasando de EPS de alto peso molecular a bajo peso molecular y con menor contenido de ácidos urónicos (Dunn *et al.*, 1992). Además, se ha demostrado que en *S. fredii* HH103 este efecto regulador de los flavonoides está mediado por elementos pertenecientes al regulón Nod como son NodD1 y NodR, siendo NodD1 imprescindible para que se lleve a cabo dicha regulación y NodR un potenciador de la producción del EPS, con lo que tanto la síntesis de EPS como la de los NF, comparten algunos de los reguladores globales. Resulta curioso que en *S. fredii* NGR234 no sea el EPS sino otros dos polisacáridos superficiales, los que estén regulados por genes inducibles por flavonoides; así, en presencia de apigenina, esta estirpe reduce la cantidad de KPS formado y produce un nuevo tipo de LPS rico en ramnosa (Simsek *et al.*, 2009; Ardissonne *et al.*, 2011). Así, incluso estirpes muy relacionadas, regulan de modo muy distinto la producción de sus diferentes polisacáridos superficiales, lo que quizás sea una estrategia para modular las interacciones con diferentes plantas hospedadoras.

En los rizobios, la producción de EPS está sometida a una alta y compleja regulación. En ella intervienen numerosos factores ambientales y reguladores (Janczarek, 2011), pero también intervienen de forma sustancial segundos mensajeros como es el caso del di-GMPc (Schäper *et al.*, 2016 y 2017). Entre los reguladores que controlan la producción de EPS se encuentran SyrM, MucR, PhoR, ExpR (a través de los sistemas de *quorum sensing*) o el sistema de dos componentes NtrY/NtrX, que regula tanto la producción de EPS I como la movilidad (Janczarek, 2011; Calatrava-Morales *et al.*, 2017). El regulador SyrM formaría parte de aquellos reguladores que son compartidos en las vías de producción de EPS y NF. En el caso de *S. meliloti* Rm1021, dicha regulación se da a través de NodD3, que actúa de forma independiente a la presencia de flavonoides y que se activa a través de SyrM, por lo que es un sistema que interviene en la producción de NF y EPS, pero de forma independiente a la presencia de flavonoides (Maillet *et al.*, 1990; Kondorosi *et al.*, 1991; Swanson *et al.*, 1993; Barnett *et al.*, 1996; Barnett *et al.*, 2004). Resultados preliminares en *S. fredii* HH103 parecen indicar que SyrM, cuya producción se induce por flavonoides y NodD1, ya que la transcripción de su gen codificante depende de una *nod box*, también está implicado en la producción de EPS y NF, además de la de otros otros compuestos como moléculas promotoras del crecimiento vegetal (ácido indol acético, AIA) (datos no publicados).

En *S. fredii* HH103, el EPS también se encuentra altamente regulado, aunque en esta estirpe el EPS no tenga un papel importante en simbiosis. Dentro de los posibles reguladores de la producción de EPS en *S. fredii* HH103, en esta Tesis nos hemos centrado en MucR, un regulador transcripcional de tipo *zinc finger* capaz de modular la expresión de genes a través de su unión a secuencias palindrómicas, *a priori* conservadas, denominadas MucR *boxes* (D'Souza-Ault *et al.*, 1993; Keller *et al.*, 1995; Bertram-Drogatz *et al.*, 1997; Janczarek y Skorupska, 2007). MucR interviene en la producción de EPS en bacterias como *S. meliloti* Rm1021, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* y *S. fredii* (HH103 y CCBAU45436) (Keller *et al.*, 1995; Janczarek y Skorupska, 2007; Acosta-Jurado *et al.*, 2016a; Jiao *et al.*, 2016). Sin embargo, los estudios más recientes han demostrado que esta proteína se puede considerar un regulador global debido a su implicación en gran cantidad de procesos como movilidad bacteriana, quimiotaxis, producción de NF además de gran cantidad de reguladores transcripcionales (Rachwał

et al., 2015; Acosta-Jurado *et al.*, 2016a; Jiao *et al.*, 2016). Debido al efecto pleiotrópico provocado por la mutación del gen *mucR1*, se producen defectos en simbiosis con plantas de soja y *L. burttii*, aunque el fenotipo mostrado en ambas plantas es diferente. En el caso de soja se producen gran cantidad de nódulos inefectivos, por lo que la planta aparenta un aspecto similar al control sin inocular. En *L. burttii*, el mutante *mucR1* sí induce la formación de nódulos fijadores, pero existe una reducción del número de los mismos y por lo tanto del peso fresco de las plantas. De manera similar, en *R. leguminosarum* bv. *trifolii* la mutación del ortólogo de *mucR1* (*rosR*) produce una reducción del número de nódulos en simbiosis con *Trifolium* (Janczarek *et al.*, 2010), y en otra estirpe de *S. fredii* (CCBAU45436) la ausencia de *mucR1* provoca la formación de gran cantidad de nódulos inefectivos en plantas de soja JD17 (Jiao *et al.*, 2016). Sin embargo, en *S. meliloti*, la mutación de *mucR* no provoca alteraciones en la simbiosis con *Medicago*, salvo que se suprima la capacidad de la bacteria, dada por la presencia del EPS, para invadir la planta (suprimiendo la capacidad de producción de EPSI y EPSII) y así se pueden observar diferencias en el desarrollo nodular independientemente de la invasión (Keller *et al.*, 1995; Mueller y González, 2011).

En nuestros estudios hemos encontrado una conexión entre la producción de EPS y la de GC extracelulares. En un trabajo previo de nuestro grupo se había comprobado que la ausencia de producción de GC daba lugar a una superproducción de EPS que al menos en parte se debe a mayor expresión del gen *exoA* (Crespo-Rivas *et al.*, 2009). En esta Tesis hemos comprobado que la ausencia de producción de EPS, ya sea por inactivación de *mucR1* o por mutación de *exoA*, da lugar a una superproducción de GC extracelulares. Estos glucanos, a diferencia de los periplásmicos que tienen residuos de fosfoglicerol, se caracterizan por ser predominantemente neutros. En este momento desconocemos cual es el nexo que conecta la regulación de la producción de EPS y GC extracelulares. Los datos transcriptómicos obtenidos para el mutante *mucR1* indican que en esta estirpe hay menor expresión de *ndvA* (que codifica la proteína que transporta los GC al periplasma) y del gen codificante de la proteína que presuntamente añadiría residuos de fosfoglicerol a los GC (SFHH103_01577), lo que podría provocar un predominio de GC neutros que se exportaran al exterior. Sería interesante estudiar si la expresión de estos genes también se ve afectada por la inactivación de *exoA*.

El papel simbiótico del EPS depende de la pareja simbiótica en la que se analice. Mutantes de *S. meliloti* en genes que intervienen en la producción de EPS, *exoY* o *exoH*, producen tubos de infección aberrantes, con lo que se da lugar a una simbiosis inefectiva (Rolfe *et al.*, 1996; van Workum *et al.*, 1997; Cheng y Walker *et al.*, 1998), repitiéndose este fenotipo en estirpes de *R. leguminosarum* (Wielbo *et al.*, 2004). Sin embargo, en *S. fredii* HH103, la ausencia total de EPS no impide que se desarrolle una simbiosis totalmente efectiva con plantas de soja, *C. cajan*, *cowpea*, *L. burtii* y *G. uralensis*, aunque con esta última se da lugar a una reducción del número de plantas noduladas (Parada *et al.*, 2006; Hidalgo *et al.*, 2008; Margaret-Oliver *et al.*, 2012). Incluso, la ausencia del EPS proporciona a *S. fredii* HH103 una mejora en cuanto a competitividad frente a la estirpe parental en plantas de soja. Al contrario ocurre en plantas de *cowpea*, donde el mutante *exoA* es menos competitivo que la estirpe parental (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014). En otros rizobios como *M. loti* R7A, la ausencia de EPS también permite una nodulación efectiva de plantas de *L. japonicus* (Kelly *et al.*, 2013). Así, se podría plantear la pregunta de si realmente el EPS constituye un componente que interviene positivamente en la simbiosis, o, por el contrario, puede constituir una estructura que “moleste” o perjudique en el desarrollo de infección en algunos rizobios. Esta última hipótesis se podría deducir a partir de los resultados obtenidos en simbiosis del mutante *exoA*, y además, teniendo en cuenta la reducción de la producción de EPS en presencia de flavonoides inductores. La ausencia total de EPS en *S. fredii* HH103 también se genera por la mutación de *mucR1*, sin embargo, debido a que esta mutación provoca un efecto pleiotrópico que incluye disminución de la expresión de genes implicados en la síntesis de NF (*nodA*), el fenotipo simbiótico no se puede atribuir exclusivamente a la ausencia de EPS.

Como se ha demostrado recientemente, el papel del EPS en simbiosis está mediado por un receptor expresado tras la detección de los NF, EPR3. Este receptor discrimina la presencia de un EPS intacto, la ausencia o alteración del mismo. Dependiendo de la alteración presentada por el EPS (en función del gen mutado en la bacteria), este receptor permite que se lleve a cabo una simbiosis efectiva, o por el contrario, detiene el proceso de infección y por lo tanto el desarrollo de la simbiosis. EPR3 no sólo está presente en plantas de *Lotus*, sino también en otras plantas como soja, lo que sugiere

que podría existir una regulación similar entre soja y *S. fredii* HH103 (Kawaharada *et al.*, 2015).

Los sistemas modelo tienen indudable interés y ofrecen paradigmas para agrupar y resumir nuestro conocimiento de un determinado proceso biológico. Sin embargo, muchos estudios ponen de manifiesto que lo que ocurre en los sistemas modelo, en nuestro campo simbiosis como *Sinorhizobium-Medicago* o *Mesorhizobium-Lotus*, no siempre es extrapolable al resto de organismos relacionados. De hecho, los estudios realizados en esta Tesis, junto con otros trabajos tanto de nuestro laboratorio como de otros grupos de investigación, evidencian que la importancia concreta de cada polisacárido superficial depende de la pareja simbiótica específica más que del tipo de nódulo que forma la leguminosa hospedadora. Además, diferentes rizobios (que pueden estar muy cercanos filogenéticamente) regulan la producción de sus diversos polisacáridos superficiales de maneras muy distintas, incluso opuestas. Un típico ejemplo es el caso de los flavonoides, que reprimen la producción de EPS en *S. fredii* HH103 y la potencian en *S. meliloti* o *R. leguminosarum*, mientras que en *S. fredii* NGR234 no influyen en la producción de EPS pero sí en la de LPS y KPS. Probablemente esta regulación de la producción de polisacáridos superficiales, tan específica en muchos casos, está relacionada con la gran importancia simbiótica de estas señales moleculares y muestra como bacterias muy relacionadas “escogen” distintos repertorios de señales para interaccionar con sus diferentes rangos de plantas hospedadoras.

CONCLUSIONES

1. La región *rkp-2* de *S. fredii* HH103 está compuesta por dos genes, *lpsL* y *rkpK*, transcripcionalmente independientes. Dicha región interviene en la producción del EPS y del LPS, pero no en la del KPS. La mutación de *rkpK* provoca la abolición de la producción del EPS, por lo que disminuye la capacidad formadora de *biofilm* y aumenta la autoagregación. La mutación en ambos genes provoca un aumento de la osmosensibilidad y capacidad de adsorción de calcoflúor y pérdida de viabilidad en presencia de rojo Congo.
2. Simbióticamente, el efecto provocado por la mutación de *lpsL* o *rkpK* depende del hospedador. En simbiosis con soja sólo el mutante en *lpsL* muestra defectos, dando lugar a una nodulación inefectiva en la que sólo se forman pseudonódulos. En plantas de *cowpea*, el mutante *rkpK* genera una reducción del número de nódulos y del peso seco de la parte aérea, mientras que el derivado *lpsL* sólo es capaz de inducir la formación de primordios nodulares. En ambas plantas el mutante *lpsL* muestra un defecto en la infección de sus raíces.
3. En la simbiosis de *S. fredii* HH103 con *Lotus burtii*, el proceso de infección se lleva a cabo mediante *crack entry*. Con este método de invasión, de los cuatro polisacáridos superficiales examinados sólo el LPS y los GC parecen ser importantes para que se desarrolle una simbiosis efectiva con esta planta, siendo los GC esenciales para la nodulación.
4. La incapacidad de *S. fredii* HH103 para nodular *Lotus japonicus* Gifu no está determinada por ninguno de los cuatro polisacáridos superficiales examinados en esta tesis: EPS, LPS, KPS y GC.
5. La producción del EPS en *S. fredii* HH103 se reduce en presencia de flavonoides inductores de los genes *nod* y, entre las estirpes estudiadas, esta característica parece ser exclusiva de HH103. Dicha regulación está mediada por el regulador transcripcional NodD1. Por el contrario, el represor global NolR, actúa como regulador positivo de la producción de EPS. Por tanto, en *S. fredii* HH103 la regulación de la producción del EPS sigue un patrón opuesto a la producción de NF y a la secreción de efectores a través de un T3SS, procesos que son inducidos por NodD1 y flavonoides y reprimidos por NolR.

6. La disminución del EPS en presencia de genisteína se traduce en una disminución de la capacidad formadora de *biofilm* y un aumento de la autoagregación.
7. El efecto de la genisteína en la reducción de la producción del EPS se debe, al menos en parte, a una disminución de la expresión de los genes *exoK* y *exoY2*, en la fase estacionaria.
8. *S. fredii* HH103 posee dos copias del gen *mucR*, *mucR1* y *mucR2*. MucR1 es un regulador global que interviene en la regulación de genes implicados en numerosos procesos tales como quimiotaxis, movilidad, producción de EPS y de NF, de forma que su mutación afecta numerosas propiedades de la bacteria. MucR2 parece no ser funcional por la presencia de una mutación puntual que altera la pauta de lectura.
9. El mutante *mucR1* de *S. fredii* HH103 está negativamente afectado en la simbiosis con las dos plantas hospedadoras estudiadas, soja y *Lotus burtii*. Sin embargo, el número de nódulos inducidos por este mutante se incrementa en soja y se reduce en *L. burtii* en comparación con la estirpe parental.

CONCLUSIONS

1. The *S. fredii* HH103 *rkp-2* region is composed by two genes, *lpsL* and *rkpK*, that are independently transcribed. This region is involved in EPS and LPS production, but not in that of KPS. The *rkpK* mutation abolishes EPS production, generating a reduction of biofilm capacity and an increase of auto-aggregation. Mutation of any of these genes provokes an increase of osmosensitivity and calcofluor adsorption and a reduction of viability on Congo red plates.
2. In symbiosis, the effects of the *lpsL* and *rkpK* mutations depend on the host plant. With soybean, the *rkpK* mutant is not affected, in contrast to the *lpsL* derivative, which was only able to induce the formation of pseudonodules. In symbiosis with cowpea, inactivation of *rkpK* resulted in a reduction of the number of nodules and the plant top dry weight, while plants inoculated with the *lpsL* derivative only formed nodule primordia that did not develop further. In addition, the *lpsL* mutant shows a defect in root infection in both plants.
3. *S. fredii* HH103 infects *Lotus burttii* roots by crack entry. For the interaction with this plant, both EPS and KPS appear to be dispensable. In contrast, LPS are important and CG essential for a successful symbiosis.
4. The *S. fredii* HH103 inability to nodulate *Lotus japonicus* Gifu plants is not determined by any of the four surface polysaccharides analysed in this thesis: EPS, LPS, KPS and CG.
5. The *S. fredii* HH103 EPS production is reduced in presence of *nod* genes inducer flavonoids and this feature, among the studied strains, appears to be exclusive of HH103. This regulation is mediated by the transcriptional regulator NodD1. On the other hand, the global repressor NolR is a positive regulator of EPS production. Therefore, in *S. fredii* HH103, the regulation of EPS biosynthesis follows an opposite pattern to that of NF production and effectors secretion through the T3SS, which are induced by NodD1 and inducer flavonoids and repressed by NolR.
6. The HH103 EPS reduction due to the presence of genistein results in diminution of biofilm formation capacity and increase of auto-aggregation.

7. The reduction of EPS production provoked by gensitein is, at least partially, due to a diminution in the expression of the *exoK* and *exoY2* genes in the stationary phase.
8. *S. fredii* HH103 harbours two copies of *mucR*, *mucR1* and *mucR2*. Since MucR1 is a global regulator which is involved in the regulation of genes involved in various processes such as chemotaxis, motility, and EPS and NF production, its mutation affects many bacterial properties. MucR2 appears not to be functional because its encoding gene carries a frameshift point mutation.
9. The *S. fredii* HH103 *mucR1* mutant is negatively affected in symbiosis with the two legume plants tested, soybean and *Lotus burttii*. However, the number of nodules induced by this mutant is increased in soybean and reduced in *L. burttii* with respect to the wild type strain.

RESÚMEN

Los rizobios son bacterias del suelo pertenecientes a las clases α - y β -*Proteobacteria* y que son capaces de llevar a cabo la fijación biológica del nitrógeno molecular en simbiosis con plantas leguminosas (Spaink *et al.*, 1998; Suzaki *et al.*, 2015). En esta relación, los rizobios inducen la formación de nuevos órganos llamados nódulos donde se diferencian a bacteroides, el estado capaz de fijar nitrógeno. Durante el proceso simbiótico tiene lugar un complejo diálogo molecular entre la planta y la bacteria, necesario para la infección de las raíces de la planta y la invasión de los nódulos formados por la planta.

Los rizobios se encuadran en diferentes géneros de bacterias, siendo los más estudiados *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (actualmente denominado *Ensifer*; Willems, 2006), *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium*, todos ellos pertenecientes a la clase α -*Proteobacteria*. Entre las leguminosas noduladas por los rizobios, se pueden encontrar varios e importantes plantas agrícolas como soja, judía y *cowpea*. La soja (*Glycine max*) es la leguminosa más importante agrónomicamente a nivel mundial ya que se puede emplear para múltiples usos como alimento humano y animal, obtención de aceites vegetales a partir de sus semillas, así como de productos “nutracéuticos” (beneficiosos para la salud) como isoflavonas, saponinas o fitoesteroles.

La soja puede ser nodulada por estirpes de diferentes especies que pertenecen a los géneros *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* (Margaret *et al.*, 2011; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2011), que a su vez pueden diferenciarse en función de su tasa de crecimiento (desde rizobios de crecimiento rápido a lento, respectivamente). *S. fredii* es una especie descubierta en China en 1985, y fue el primer rizobio de crecimiento rápido que incluía estirpes capaces de nodular soja. Las estirpes de *S. fredii* son capaces de nodular un alto número de leguminosas, pero muestran diferencias en su capacidad de nodular diferentes variedades de soja. De hecho, las tres estirpes más estudiadas hasta ahora difieren en esta característica: *S. fredii* NGR234 no es capaz de nodular soja, *S. fredii* USDA257 nódula variedades asiáticas de soja, pero es inefectivo con variedades americanas, y *S. fredii* HH103 es capaz de nódular ambos cultivares de soja, asiáticos y americanos.

La simbiosis requiere un coordinado intercambio de señales entre la planta y el rizobio, y sólo cuando ambos simbioses son compatibles, tiene lugar el proceso de nodulación (Downie, 2007; López-Baena *et al.*, 2016). Este proceso comienza con la secreción, por parte de la planta, de un grupo de compuestos fenólicos llamados flavonoides que interaccionan con un regulador transcripcional bacteriano de tipo LysR, NodD. Sólo los flavonoides compatibles son capaces de activar este regulador. Por lo tanto, este paso establece una barrera de especificidad simbiótica para seleccionar sólo los simbioses compatibles. Posteriormente, NodD activa la expresión de genes mediante su unión a secuencias específicas y conservadas de ADN localizadas aguas arriba de estos genes y denominadas *nod boxes* (NB). Uno de los grupos de genes activados por NodD son aquellos (genes *nod*) responsables de la síntesis de los factores Nod (NF). Los NF son moléculas de lipo-quito-oligosacáridos compuestas de 2 a 6 residuos de N-acetil-glucosamina unida por enlaces β -1,4. El residuo de N-acetil-glucosamina localizado en el extremo no reductor se encuentra acilado por un ácido graso. Los NF pueden estar decorados con diferentes tipos de sustituciones (grupos fucosilos, metilos, sulfatos y acetilos) y ácidos grasos. Los NF se detectan por parte de la planta a través de los receptores de los NF (NFRs) localizados en las membranas de los pelos radicales. Este paso establece otra barrera simbiótica ya que el reconocimiento de los NF apropiados promueve la infección bacteriana y el inicio del desarrollo nodular. En caso positivo, el reconocimiento de los NF provoca una oscilación de la concentración de calcio dentro de los pelos radicales que, a través de una cascada de señalización, provoca diferentes respuestas, principalmente la curvatura del pelo radical (atrapando la población de rizobios) y formación de primordios nodulares. Posteriormente, la bacteria penetra dentro del pelo radical a través de unas estructuras tubulares llamadas tubos de infección y eventualmente se liberan a células vegetales poliploides localizadas dentro de los nódulos. Dentro de estas células, las bacterias se diferencian en bacteroides y llevan a cabo la fijación de nitrógeno. Además de la infección a través de pelos radicales, existe otro método de infección llamado *crack entry*, donde la bacteria entra en las raíces a través de heridas en la superficie radical.

Además de los NF, hay otras señales bacterianas que juegan papeles clave en la interacción simbiótica (Downie, 2010; López-Baena *et al.*, 2016). Estas señales incluyen

proteínas efectoras (llamadas Nops, *nodulation outer protein*), que se liberan al interior de las células hospedadoras a través del sistema de secreción de tipo III, y polisacáridos superficiales. En cuanto a los polisacáridos superficiales, los principales involucrados en simbiosis son los lipopolisacáridos (LPS) y los polisacáridos capsulares (KPS), los cuales se anclan a la membrana externa, los glucanos cíclicos (GC), localizados en el espacio periplásmico, y los exopolisacáridos (EPS), que se liberan al medio extracelular o están débilmente unido a la superficie bacteriana. Se piensa que las Nops y los polisacáridos superficiales tienen papeles importantes en la interacción simbiótica como la disminución de la respuesta defensiva de la planta y/o actuando como señal simbiótica que se requiere a lo largo de las diferentes etapas del proceso de nodulación.

Nuestro grupo de investigación ha trabajado en el estudio de la interacción simbiótica de *S. fredii* HH103 con diferentes plantas hospedadoras, incluyendo soja, desde hace más de 30 años (Margaret *et al.*, 2011; López-Baena *et al.*, 2016). Recientemente, hemos secuenciado el genoma de HH103 (Vinardell *et al.*, 2015), compuesto por el cromosoma (4,3 Mb) y seis plásmidos, los cuales se nombran con una letra en función del tamaño del plásmido, pSfhh103a1 (~24 Kb), pSfhh103a2 (~25 Kb), pSfhh103b (~62 Kb), pSfhh103c (~144 Kb), pSfhh103d (~589 Kb) y pSfhh103e (~2,1 Mb). Durante los últimos 15 años, nuestro grupo ha estudiado los diferentes polisacáridos superficiales centrándose en sus estructuras, su relevancia simbiótica con diferentes plantas hospedadoras y la regulación de su producción. **El principal objetivo de esta tesis era profundizar en la investigación de algunos aspectos específicos de los polisacáridos superficiales de *S. fredii* HH103. Específicamente, los objetivos concretos de esta tesis eran:**

1. Caracterizar la región genética *rkp-2* de *S. fredii* HH103 y estudiar su implicación en la producción de diferentes polisacáridos superficiales.
2. Estudiar la relevancia de los diferentes polisacáridos superficiales de *S. fredii* HH103 en su interacción simbiótica con la leguminosa modelo *Lotus*.
3. Estudiar la regulación de la producción de EPS mediada por flavonoides en *S. fredii* HH103.

4. Caracterizar los genes *mucR1* y *mucR2* de *S. fredii* HH103 y estudiar su papel regulador sobre los genes involucrados en la producción de EPS.

Objetivo 1. Los resultados presentados en el correspondiente capítulo han sido publicados en *Plant and Soil* (Acosta-Jurado *et al.*, 2017. *Plant and Soil*. Doi:10.1007/s11104-017-3268-z).

En *S. meliloti* Rm41, los genes relacionados con la producción de KPS se distribuyen entre tres regiones genéticas (López-Baena *et al.*, 2016), *rkp-1*, involucrada en la síntesis del lípido transportador del KPS, *rkp-3*, implicada en el transporte y síntesis de la subunidad de repetición del KPS, y *rkp-2*, compuesto por dos genes cuyos productos son responsables de la producción de ácido UDP-galacturónico desde el ácido UDP-glucurónico, catalizado por *LpsL*, y ácido UDP-glucurónico desde UDP-glucosa, catalizado por *RkpK*. Ambos genes se requieren para la producción de LPS, y *rkpK* también es necesario para la biosíntesis de KPS debido a la presencia de ácido glucurónico en este polisacárido. Estas tres regiones también están presentes en *S. fredii* HH103. En trabajos anteriores, nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo los estudios de las regiones *rkp-2* y *rkp-2* y ha demostrado su implicación en la producción de KPS, así como la de la región *rkp-3* en la síntesis de LPS. En esta tesis, hemos investigado la implicación de la región *rkp-2* en la producción de los polisacáridos superficiales de HH103.

En este trabajo, hemos demostrado que los genes *lpsL* y *rkpK* de *S. fredii* HH103 no forman una unidad transcripcional y que la tasa de transcripción de *rkpK* es mucho mayor que la de *lpsL*. Los experimentos de PAGE mostraron que la inactivación de cada uno de estos genes dio lugar a alteraciones en el LPS, pero no afectó a la producción de KPS (confirmado por H-NMR), lo cual está en consonancia con la ausencia de ácidos urónicos en este polisacárido en *S. fredii* HH103. La mutación de *rkpK* también tuvo impacto sobre la producción del exopolisacárido (EPS), probablemente por la presencia de ácido glucurónico en este polisacárido. El aspecto sobre placas de YMA, cuantificación de los equivalentes de glucosa en medio YM y los experimentos de H-RMN confirmaron que la inactivación de *rkpK* no provoca una alteración del EPS sino una incapacidad para producir este polisacárido, sugiriendo que la disponibilidad de ácido glucurónico es esencial para la biosíntesis de EPS. El mutante *rkpK* mostró un incremento en la auto-agregación y osmosensibilidad y una reducción de la formación

del *biofilm* sobre superficies plásticas. La inactivación de *rkpK* afectó negativamente a la simbiosis con *cowpea* (una reducción de alrededor del 50% del número de nódulos fijadores de nitrógeno) pero no con soja. La mutación de *lpsL* condujo a una deficiencia completa con *cowpea*, mientras que las plantas de soja inoculadas con este mutante sólo formaron pseudonódulos. En ambas plantas, el mutante *lpsL* mostró defectos en la infección de sus raíces. Los resultados presentados en este capítulo están son un buen ejemplo de como en dos bacterias íntimamente relacionadas (como *S. meliloti* y *S. fredii*) el mismo gen puede estar involucrado en la producción de diferentes polisacáridos superficiales, así que la inactivación de ese gen puede tener un impacto diferente en la capacidad simbiótica de estas bacterias con sus plantas hospedadoras. Además, nuestros resultados están en consonancia con trabajos anteriores de nuestro grupo demostrando la alta relevancia del LPS de HH103 en simbiosis con diferentes plantas hospedadoras.

Objetivo 2. Los resultados presentados en el correspondiente capítulo han sido publicados en *Molecular Plant-Microbe Interactions* (Acosta-Jurado *et al.*, 2016a. Mol Plant Microbe Interact. 29:925-937).

En trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación se ha demostrado que *S. fredii* HH103 induce nódulos fijadores de nitrógeno en *Lotus burtii* pero nódulos inefectivos en *L. japonicus* Gifu (Sandal *et al.*, 2012). En nuestro laboratorio tenemos disponible una colección de mutantes de HH103 afectados en la producción de diferentes polisacáridos superficiales. En esta tesis, hemos usado esta colección para investigar el posible papel (positivo o negativo) de cada uno de los polisacáridos superficiales de HH103 en su interacción con *L. burtii* y *L. japonicus* Gifu. Además, los estudios de microscopia confocal demostraron que *S. fredii* HH103 penetra en las raíces de *L. burtii* a través de roturas epidérmicas (de manera dependiente de factores Nod), a diferencia de *Mesorhizobium loti* MAFF303099 que infecta esta planta mediante tubos de infección (Maekawa *et al.*, 2009). En cuanto a la interacción con *L. burtii*, los mutantes de *S. fredii* HH103 incapaces de producir KPS y/o EPS no mostraron ningún tipo de defecto simbiótico, a diferencia de aquellos que tienen un perfil de LPS alterado, los cuales estuvieron afectados negativamente (se dieron reducciones severas del número de nódulos fijadores de nitrógeno). El mutante de *S. fredii* HH103 del gen *cgs*, incapaz de

producir GC, mostró el mismo fenotipo simbiótico que con otras plantas hospedadoras (Crespo-Rivas *et al.*, 2009); totalmente deficiente. Por otro lado, ninguno de los mutantes de *S. fredii* HH103 en polisacáridos superficiales ganó una nodulación efectiva con *L. japonicus* Gifu, sugiriendo que ninguno de estos polisacáridos es el responsable de la incompatibilidad simbiótica de *S. fredii* HH103 con esta planta.

Objetivo 3. Los resultados presentados en el correspondiente capítulo han sido publicados en *PLOS ONE* (Acosta-Jurado *et al.*, 2016b. PLOS ONE. 11:e0160499).

A pesar del hecho que el EPS no muestra un papel importante en la simbiosis de *S. fredii* HH103 con diferentes leguminosas hospedadoras como soja, *cowpea*, *Glycyrrhiza uralensis* y *Lotus burtii* (Parada *et al.*, 2006; Hidalgo *et al.*, 2010; Margaret-Oliver *et al.*, 2012; Acosta-Jurado *et al.*, 2016a), la producción de este polisacárido está altamente regulado. Anteriores trabajos de nuestro grupo demostraron que la presencia de genisteína, un flavonoide inductor de los genes *nod* (Vinardell *et al.*, 2004b), provocó una disminución de la mucosidad de HH103 en placas de YMA (Vinardell *et al.*, 2004a). En esta tesis se demuestra que esta disminución de la mucosidad se debe a una reducción de la producción de exopolisacárido (confirmado por cuantificación de equivalentes de glucosa y análisis de H-RMN), y que este fenómeno no se da en otras estirpes de *S. fredii* como USDA257 o NGR234. Esta regulación negativa de la producción de EPS depende tanto de la capacidad del flavonoide para inducir la expresión de los genes *nod* como de la presencia de NodD1, indicando que, en *S. fredii* HH103, la biosíntesis de este polisacárido está conectada con el regulón *nod*. De hecho, en estudios anteriores hemos demostrado que NolR, un represor de los genes *nod*, tiene un efecto positivo sobre la producción de EPS en HH103. Teniendo en cuenta la importancia del EPS para los *biofilm* bacterianos, esta reducción de la producción de EPS por el tratamiento con flavonoides se correlaciona con la reducción de la capacidad formadora de *biofilm*. Mediante el uso de análisis de RT-PCR cuantitativa hemos demostrado que la expresión de los genes *exoY1* y *exoK* se reprimió en cultivos de fase estacionaria de *S. fredii* HH103 en presencia de genisteína, siendo esta represión mayor en ausencia de NolR. Así, los resultados presentados en este trabajo demostraron que en la producción de EPS en *S. fredii* HH103 se regula de forma opuesta a otras señales bacterianas como los factores Nod y los efectores del sistema de secreción de tipo 3: Se

reprime por flavonoides y NodD1 y se potencia por NodR. Estos resultados son acordes con nuestras observaciones anteriores en las que la ausencia de la producción de EPS en *S. fredii* HH103 no sólo no va en detrimento, sino que es beneficiosa para la simbiosis con soja. Además, nuestros resultados mostraron como bacterias íntimamente relacionadas pueden diferir en la regulación de sus polisacáridos superficiales: en *S. fredii* NGR234 la presencia de flavonoides disminuye la cantidad de KPS producido y promueve la biosíntesis de un tipo nuevo de LPS mientras que en HH103 afecta negativamente a la producción de EPS.

Objetivo 4. Los resultados presentados en el correspondiente capítulo han sido publicados en *Molecular Plant-Microbe Interactions* (Acosta-Jurado *et al.*, 2016c. Mol Plant Microbe Interact. 29:700-712).

En los rizobios, el control de la producción de EPS es muy complejo y conlleva la participación de numerosas proteínas reguladoras, segundos mensajeros como di-GMP-c y sistemas de *quorum sensing*. Dentro de los reguladores, la proteína de tipo *zinc finger* MucR potencia la producción de EPS en los rizobios, como *Sinorhizobium meliloti* y *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, y participa en diversos procesos en otras bacterias como *Caulobacter*, *Pseudomonas* o *Brucella* (Janczarek, 2011; Mirabella *et al.*, 2013; Caswell *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). MucR regula la expresión génica mediante su unión a secuencias palindrómicas llamadas *mucR boxes*. Estudios recientes han demostrado que esta proteína puede considerarse como un regulador global ya que está involucrado en el control de la expresión de genes de movilidad, quimiotaxis, virulencia e incluso NF, dependiendo de la bacteria. La secuenciación reciente del genoma de *S. fredii* HH103 ha revelado la presencia de dos copias de *mucR* en esta estirpe, *mucR1* y *mucR2*. En esta tesis, hemos estudiado estos genes, centrándonos en su relevancia en la producción de EPS y en la simbiosis con soja y *L. burttii*. Como ha sido recientemente descrito en *mucR2* de CCBAU45436 (Jiao *et al.*, 2016), probablemente MucR2 de *S. fredii* HH103 no sea funcional debido a un cambio de pauta de lectura en su gen codificante. De hecho, el mutante *mucR2* de *S. fredii* HH103 no mostró ninguna diferencia con la estirpe silvestre en ninguna de las características analizadas en este trabajo. Por el contrario, la inactivación de *mucR1* provoca una reducción drástica de la producción de EPS, confirmado por aspecto de la mucosidad en placas de YMA, experimentos de H-

NMR y cuantificación de los equivalentes de glucosa. Inesperadamente, el mutante *ΔmucR1* mostró un incremento notable en su capacidad formadora de *biofilm*, probablemente debido al incremento de la agregación en la interfase aire-líquido. Además, la producción de GC extracelulares se incrementó en este mutante, probablemente como consecuencia de la reducción en la producción de EPS. Este mutante también mostró una reducción drástica de la capacidad fijadora de nitrógeno con *G. max* y *L. burttii*. Sin embargo, en estas dos leguminosas, el número de nódulos inducidos por el mutante *mucR1* se incrementó y redujo respectivamente en comparación con la estirpe parental, indicando que MucR1 pueda afectar de forma diferente a la nodulación dependiendo de la planta hospedadora. Los análisis de RNA-Seq llevados a cabo en presencia y ausencia de flavonoides demostraron que MucR1 controla la expresión de cientos de genes (incluyendo algunos relacionados con la movilidad, producción de EPS o transporte de GC), algunos de ellos relacionados con el regulón *nod*. Estos estudios confirmaron trabajos anteriores indicando que en los rizobios MucR es un regulador global que controla numerosos procesos que pueden ser importantes en la transición de vida libre al estado simbiótico.

Referencias:

Acosta-Jurado, S., Alias-Villegas, C., Navarro-Gómez, P., Zehner, S., Murdoch, P.D., Rodríguez-Carvajal, M.A., Soto, M.J., Ollero F.J., Ruiz-Sainz, J.E., Göttfert, M., Vinardell, J.M. 2016c. The *Sinorhizobium fredii* HH103 MucR1 global regulator is connected with the *nod* regulon and is required for efficient symbiosis with *Lotus burttii* and *Glycine max* cv. Williams. *Mol Plant Microbe Interact.* 29:700-712.

Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., Murdoch, P. del S., Crespo-Rivas, J.C., Jie, S., Cuesta-Berrio, L., Ruiz-Sainz, J.E., Rodríguez-Carvajal, M.A., Vinardell, J.M. 2016b. Exopolysaccharide production by *Sinorhizobium fredii* HH103 is repressed by genistein in a NodD1-dependent manner. *PLoS One.* 11:e0160499.

Acosta-Jurado, S., Rodríguez-Navarro, D.N., Kawaharada, Y., Perea, J.F., Gil-Serrano, A., Jin, H., An Q, Rodríguez-Carvajal, M.A., Andersen, S.U., Sandal, N., Stougaard, J., Vinardell, J.M., Ruiz-Sainz, J.E. 2016a. *Sinorhizobium fredii* HH103 invades

Lotus burtii by crack entry in a nod factor-and surface polysaccharide-dependent manner. Mol Plant Microbe Interact. 29:925-937.

Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., Crespo-Rivas, J.C., Medina, C., Murdoch, P. del S., Cuesta-Berrio, L., Rodríguez-Carvajal, M.A., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M. 2017. The *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103 *rkp-2* region is involved in the biosynthesis of lipopolysaccharide and exopolysaccharide but not in K-antigen polysaccharide production. Plant Soil. doi:10.1007/s11104-017-3268-z.

Ardissone, S., Kobayashi, H., Kambara, K., Rummel, C., Noel, K.D., Walker, G.C., Broughton, W.J., Deakin, W.J. 2011. Role of BacA lipopolysaccharide synthesis, peptide transport, and nodulation by *Rhizobium* sp. Strain NGR234. J. Bacteriol. 193:2218-2228.

Caswell, C.C., Elhassanny, A.E., Planchin, E.E., Roux, C.M., Weeks-Gorospe, J.N., Ficht, T.A., Dunman, P.M., Roop, R.M. 2013. Diverse genetic regulon of the virulence-associated transcriptional regulator MucR in *Brucella abortus* 2308. Infect Immun. 81:1040-51.

Crespo-Rivas, J.C., Margaret, I., Hidalgo, A., Buendía-Clavería, A.M., Ollero, F.J., López-Baena, F.J., del Socorro Murdoch, P., Rodríguez-Carvajal, M.A., Soria-Díaz, M.E., Reguera, M., Lloret, J., Sumpton, D.P., Mosely, J.A., Thomas-Oates, J.E., van Brussel, A.A., Gil-Serrano, A., Vinardell, J.M., Ruiz-Sainz, J.E. 2009. *Sinorhizobium fredii* HH103 *cgs* mutants are unable to nodulate determinate- and indeterminate nodule-forming legumes and overproduce an altered EPS. Mol. Plant Microbe Interact. 22:575–588.

Downie, J.A. 2007. Plant science–infectious heresy. Science 316: 1296–1297.

Downie, J.A. 2010. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. FEMS Microbiol Rev 34:150-170.

Hidalgo, A., Margaret, I., Crespo-Rivas, J.C., Parada, M., Murdoch, P.S., López, A., Buendía-Clavería, A.M., Moreno, J., Albareda, M., Gil-Serrano, A.M., Rodríguez-Carvajal, M.A., Palacios, J.M., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M. 2010. The *rkpU* gene of *Sinorhizobium fredii* HH103 is required for bacterial K-antigen polysaccharide production and for efficient nodulation with soybean but not with cowpea. Microbiology. 156:3398–3411.

Janczarek, M. 2011. Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. *Int. J. Mol. Sci.* 12:7898–7933.

Jiao, J., Wu, L.J., Zhang, B., Hu, Y., Li, Y., Zhang, X.X., Guo, H.J., Liu, L.X., Chen, W.X., Zhang, Z., Tian, C.F. 2016. MucR is required for transcriptional activation of conserved ion transporters to support nitrogen fixation of *Sinorhizobium fredii* in soybean nodules. *Mol Plant Microbe Interact.* 29:352-61.

López-Baena, F.J., Ruiz-Sainz, J.E., Rodríguez-Carvajal, M.A., Vinardell, J.M. 2016. Bacterial molecular signals in the *Sinorhizobium fredii*-soybean symbiosis. *Int. J. Mol. Sci.* 17, E755.

Maekawa, T., Maekawa-Yoshikawa, M., Takeda, N., Imaizumi-Anraku, H., Murooka, Y., Hayashi, H. 2009. Gibberellin controls the nodulation signaling pathway in *Lotus japonicus*. *Plant. J.* 58:183-194.

Margaret, I., Becker, A., Blom, J., Bonilla, I., Goesmann, A., Göttfert, M., Lloret, J., Mittard-Runte, V., Ruiz-Sainz, J. E., Vinardell, J. M., Weidner, S. 2011. Symbiotic properties and first analyses of the genomic sequence of the fast growing model strain *Sinorhizobium fredii* HH103 nodulating soybean. *J. Biotechnol.* 155:11-19.

Margaret-Oliver, I., Lei, W., Parada, M., Rodríguez-Carvajal, M.A., Crespo-Rivas, J.C., Hidalgo, A., Gil-Serrano, A., Moreno, J., Rodríguez-Navarro, D.N., Buendía-Clavería, A., Ollero, J., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M. 2012. *Sinorhizobium fredii* HH103 does not strictly require KPS and/or EPS to nodulate *Glycyrrhiza uralensis*, an indeterminate nodule-forming legume. *Arch. Microbiol.* 194:87–102.

Mirabella, A., Terwagne, M., Zygmunt, M.S., Cloeckert, A., De Bolle, X., and Letesson, J.J. 2013. *Brucella melitensis* MucR, an orthologue of *Sinorhizobium meliloti* MucR, is involved in resistance to oxidative, detergent, and saline stresses and cell envelope modifications. *J. Bacteriol.* 195:453-465.

Parada, M., Vinardell, J.M., Ollero, F.J., Hidalgo, A., Gutiérrez, R., Buendía-Clavería, A.M., Lei, W., Margaret, I., López-Baena, F.J., Gil-Serrano, A.M., Rodríguez-Carvajal, M.A., Moreno, J., Ruiz-Sainz, J.E. 2006. *Sinorhizobium fredii* HH103 mutants affected in capsular polysaccharide (KPS) are impaired for nodulation with soybean and *Cajanus cajan*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 19, 43–52

Rodríguez-Navarro, D.N., Margaret Oliver, I., Albareda Contreras, M. Ruiz-Sainz, J. E. 2011. Soybean interactions with soil microbes, agronomical and molecular aspects. *Agron. Sustain. Dev.* 31:173-190.

Sandal, N., Jin, H., Rodríguez-Navarro, D.N., Temprano, F., Cvitanich, C., Brachmann, A., Sato, S., Kawaguchi, M., Tabata, S., Parniske, M., Ruiz-Sainz, J.E., Andersen, S.U., Stougaard, J. 2012. A set of *Lotus japonicus* Gifu x *L. burtii* recombinant inbred lines facilitates map-based cloning and QTL mapping. *DNA Res.* 19:317-323.

Simsek, S., Ojanen-Reuhs, T., Marie, C., Reuhs, B.L. 2009. An apigenin-induced decrease in K-antigen production by *Sinorhizobium* sp. NGR234 is *y4gM*- and *nodD1*-dependent. *Carbohydr Res.* 344: 1947-1950.

Spaink, H.P., Kondorosi, A., Hooykaas, P.J.J. 1998. The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria. Dordrecht: Kluwer Acad. 566 pp.

Suzaki T., Yoro, E., Kawaguchi, M. 2015. Leguminous plants: inventors of root nodules to accomodate symbiotic bacteria. *klnt Rev Cell Mol Biol.* 316:111-58.

Vinardell, J.M., López-Baena, F.J., Hidalgo, A., Ollero, F.J., Bellogín, R.A., Espuny, M.R., Temprano, F., Romero, F., Krishnan, H.B., Pueppke, S.G., Ruiz-Sainz, J.E. 2004a. The effect of FITA mutations on the symbiotic properties of *S. fredii* varies in a chromosomal-background-dependent manner. *Arch Microbiol.* 181:144-154.

Vinardell, J.M., Ollero, F.J., Hidalgo, Á., López-Baena, F.J., Medina, C., Ivanov-Vangelov, K., Parada, M., Madinabeitia, N., Espuny, M. del R., Bellogín, R. A., Camacho, M., Rodríguez-Navarro, D.N., Soria-Díaz, M.E., Gil-Serrano, A.M., Ruiz-Sainz, J.E. 2004b. NodR regulates diverse symbiotic signals of *Sinorhizobium fredii* HH103. *Mol Plant Microbe Interact.* 17:676-685.

Vinardell, J.M., Acosta-Jurado, S., Zehner, S., Gottfert, M., Becker, A., Baena, I., Blom, J., Crespo-Rivas, J.C., Goesmanns, A., Jaenickes, S., Krol, E., McIntosh, M., Margaret, I., Pérez-Montañó, F., Schneiker-Bekels, S., Serranias, J., Szczepanowski, R., Buendía, A.M., Lloret, J., Bonilla, I., Pühler, A., Ruiz-Sainz, J.E., Weidner, S. 2015. The *Sinorhizobium fredii* HH103 genome: a comparative analysis with *S. fredii* strains

differing in their symbiotic behavior with soybean. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 28:811-824.

Wang, Y., Hay, I.D., Rehman, Z.U., Rehm, B.H. 2015. Membrane-anchored MucR mediates nitrate-dependent regulation of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99:7253-65.

Willems, A. 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil.* 287:3-14.

SUMMARY

Rhizobia are soil α - and β -proteobacteria able to establish a nitrogen-fixing symbiosis with legume plants (Spaink *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2015). In this relationship, rhizobia induce the formation of new organs called nodules where they differentiated to bacteroids, the bacterial form able to fix nitrogen. The symbiotic process requires a complex molecular dialogue between plant and bacteria resulting in root infection the invasion of the nodules formed by the plant.

There are different bacterial genera than can be included in the rhizobia group, being the most studied *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (currently *Ensifer*; Willems, 2006), *Bradyrhizobium* and *Mesorhizobium*, all of them belonging to α -Proteobacteria. Among the legumes nodulated by rhizobia, there are several highly important crop plants like soybean, bean and cowpea. Soybean (*Glycine max*) is the most important worldwide agronomic legume since it can be used for multiple targets, such as for human and animal feeding, to get vegetal oil from its seeds and nutraceutical molecules like isoflavones, saponines or phytosterols, which are beneficial to human health.

Soybean can be successful nodulated by strains belonging to different species of the *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* and *Bradyrhizobium* genera (Margaret *et al.*, 2011; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2011), which can be differentiated according to their growth rate (from fast growing bacteria to slow growing bacteria, respectively). *S. fredii* is a species discovered in China, in 1985, and was the first fast growing bacteria that includes strains able to nodulate soybean. *S. fredii* strains are able to nodulate a very high number of host legumes but show differences in their ability to nodulate different soybean varieties. In fact, the three strains more studied so far differ in this ability: *S. fredii* NGR234 is not able to nodulate soybean, *S. fredii* USDA257 nodulates Asiatic soybeans but it is ineffective with American varieties, and *S. fredii* HH103 is able to nodulate both, American and Asiatic, soybean cultivars.

The symbiosis requires a coordinated signal exchange between plants and rhizobia, and only when both symbionts are compatible, the nodulation process takes place (Downie, 2007; López-Baena *et al.*, 2016). This process starts with the secretion by legume roots of a group of phenolic compounds called flavonoids that interact with a bacterial LysR

transcriptional regulator, NodD. Only compatible flavonoids will activate the bacterial NodD protein. Therefore, this step establishes a symbiotic specificity barrier to select compatible symbionts. In turn, NodD activates bacterial nodulation gene expression by binding to specific and conserved DNA sequence, named *nod* boxes (NB), located upstream of these genes. One of the groups of genes activated by NodD are those one (*nod* genes) responsible for Nod factors (NF) synthesis. NF are lipochitooligosaccharide molecules composed of 2 to 6 residues of N-Acetyl-Glucosamine residues linked by β -1,4 glycosidic bonds. The N-Acetyl-glucosamine residue located on the non-reducing end is acylated with a fatty acid. NF can be decorated in different manners with different substitutions (fucosyl, methyl, sulphate and acetyl groups) and types of fatty acids. NF are perceived by the plant through Nod Factor membrane receptors (NFRs) located in the root hair membranes. This step entails another symbiotic barrier since only the recognition of appropriate NF will elicit bacterial infection and the initiation of nodule development. In a positive case, NF recognition will cause a specific calcium spiking inside root hairs that, through a signalling cascade will provoke different responses, mainly root hair curling (trapping a rhizobial population) and nodule primordia formation. Bacteria will penetrate inside the root hairs through tubular structures called infection threads and eventually will be delivered into polyploid plant cells located inside nodules. Inside those cells, bacteria will differentiate into bacteroids and fix nitrogen. Besides of root hair infection, there is another infection way named crack entry, in which the bacteria enter into the root through injuries of the root surface (Downie, 2010; López-Baena *et al.*, 2016).

In addition to NF, there are other bacterial signals that play key roles in the symbiotic interaction. These signals include effector proteins (called Nops, for nodulation outer proteins) delivered into host cells through a type III secretion system, and surface polysaccharides. Regarding surface polysaccharides, the main ones involved in symbiosis are Lipopolysaccharides (LPS) and capsular polysaccharides (KPS), which are anchored into the external membrane, the cyclic glucans (CG), located in the periplasmic space, and exopolysaccharides (EPS), that are released to the cell milieu or are weakly bound to their surface. Nops and surface polysaccharide are thought to have important

roles in the interaction such as diminishing plant defence responses and/or acting as symbiotic signals required along different steps of the nodulation process.

Our research group has been working in the study of the symbiotic interaction of *S. fredii* HH103 with different host plants, including soybean, for more than 30 years (Margaret *et al.* 2011; López-Baena *et al.*, 2016). Recently, our group has sequenced the HH103 genome (Vinardell *et al.*, 2015) revealing that it is composed by the chromosome (4.3 Mb) and six plasmids, which are named with a letter depending on the plasmid size, pSfhh103a1 (~24 Kb), pSfhh103a2 (~25 Kb), pSfhh103b (~62 Kb), pSfhh103c (~144 Kb), pSfhh103d (~589 Kb) y pSfhh103e (~2.1 Mb). During the last 15 years, our group has studied different HH103 surface polysaccharides focusing in their structures, their symbiotic relevance with different host legumes and the regulation of their production.

The main objective of this thesis was to further research some specific aspects of *S. fredii* HH103 surface polysaccharides. More specifically, the concrete objectives of this work were:

1. To characterize the *S. fredii* HH103 *rkp-2* genetic region and to study its involvement in the production of different surface polysaccharides.
2. To study the relevance of different *S. fredii* HH103 surface polysaccharides in its symbiotic interaction with the model legume *Lotus*.
3. To study the flavonoid-mediated regulation of exopolysaccharide (EPS) production by *S. fredii* HH103.
4. To characterize the *S. fredii* HH103 *mucR1* and *mucR2* genes and to study their putative regulatory role on genes involved in EPS production.

Objective 1. The results presented in the corresponding chapter has already been published in Plant and Soil (Acosta-Jurado *et al.*, 2017. Plant and Soil. doi:10.1007/s11104-017-3268-z).

In *S. meliloti* Rm41, genes related to KPS production are distributed among three genetic regions (López-Baena *et al.*, 2016), *rkp-1*, involved in the synthesis of the KPS lipid carrier, *rkp-3*, involved in KPS export and in the synthesis of the KPS repetition subunit, and *rkp-2*, composed by two genes whose encoded products are involved in the

production of UDP-galacturonic acid from UDP-glucuronic acid, catalysed by *LpsL*, and UDP-glucuronic acid from UDP-glucose, catalysed by *RkpK*. Both genes are required for LPS production, and *rkpK* is also needed for KPS biosynthesis due to the presence of glucuronic acid in this polysaccharide. These three *rkp* regions are also present in *S. fredii* HH103. In previous works, our research group had already studied the *rpk-1* and *rpk-3* regions and demonstrated its involvement in KPS production as well as that of *rpk-3* in LPS synthesis. In this thesis, we have investigated the involvement of the *rkp-2* region in HH103 surface polysaccharides production.

In this work, we showed that in *S. fredii* HH103 *lpsL* and *rkpK* do not form a transcriptional unit and that the transcriptional rate of *rkpK* is much higher than that of *lpsL*. PAGE experiments showed that inactivation of each of these genes resulted in alterations in LPS, but did not affect KPS production (confirmed by H-NMR), which agrees with the lack of uronic acids in *S. fredii* HH103 KPS. Mutation of *rkpK* also had an impact on HH103 exopolysaccharide (EPS) production, most probably due to the presence of glucuronic acid in this polysaccharide. Mucoïdy scoring on YMA plates, quantification of glucose equivalents on YM medium and H-NMR experiments confirmed that *rkpK* inactivation not resulted in an altered EPS but in the inability to produce this polysaccharide, suggesting that the availability of glucuronic acid is essential for EPS biosynthesis. The *rkpK* mutant exhibited increased bacterial autoaggregation and osmosensitivity and decreased biofilm formation on plastic surfaces. Inactivation of *rkpK* affected negatively symbiosis with cowpea (about 50% reduction on the number of nitrogen-fixing nodules) but not with soybean. Mutation of *lpsL* led to a complete symbiotic impairment with cowpea, whereas soybean plants inoculated with this mutant only formed pseudonodules. In both plants, the *lpsL* mutant showed defects in root infection. The results presented in this chapter are a good example of that in very close-related bacteria (such as *S. meliloti* and *S. fredii*) the same gene can be involved in the production of different surface polysaccharides, so inactivation of that gene may have a very different impact in the symbiotic abilities of these bacteria with their host plants. In addition, our results are in agreement with previous works of our group showing the high relevance of HH103 LPS in its symbiosis with different host legumes.

Objective 2. The results presented in the corresponding chapter has already been published in *Molecular Plant-Microbe Interactions* (Acosta-Jurado *et al.*, 2016a. *Mol Plant Microbe Interact.* 29:925-937).

Previous works of our group had shown that *S. fredii* HH103 induces nitrogen-fixing nodules in *Lotus burttii* but ineffective nodules in *L. japonicus* Gifu (Sandal *et al.*, 2012). In our laboratory there is available a collection of HH103 mutants affected in the production of different surface polysaccharides. In this thesis, we have used this collection in order to investigate the putative role (positive or negative) of each HH103 surface polysaccharide in its interaction with *L. burttii* and *L. japonicus* Gifu. In addition, confocal microscopy studies showed that *S. fredii* HH103 penetrates *L. burttii* roots through epidermal cracks (in a Nod-factor-dependent manner), in contrast to *Mesorhizobium loti* MAFF303099 that infect this plant through infection threads (Maekawa *et al.*, 2009). Regarding interaction with *L. burttii*, *S. fredii* HH103 mutants unable to produce KPS and/or EPS did not show any kind of symbiotic defect, in contrast to those HH103 derivatives having an altered LPS, which were negatively affected (strong reductions of the number of nitrogen-fixing nodules formed). A *S. fredii* HH103 *cgs* derivative, unable to produce GC, showed the same symbiotic phenotype as with other host plants (Crespo-Rivas *et al.*, 2009); full impairment. On the other hand, none of the *S. fredii* HH103 surface-polysaccharide mutants gained effective nodulation with *L. japonicus* Gifu, suggesting that none of these polysaccharides is responsible for this symbiotic incompatibility.

Objective 3. The results presented in the corresponding chapter has already been published in *PLOS ONE* (Acosta-Jurado *et al.*, 2016b. *PLOS ONE.* 11:e0160499).

Despite the fact that EPS does not show an important role in *S. fredii* HH103 symbiosis with different host legumes such as soybean, cowpea, *Glycyrrhiza uralensis* and *Lotus burttii* (Parada *et al.*, 2006; Hidalgo *et al.*, 2010; Margaret-Oliver *et al.*, 2012; Acosta-Jurado *et al.*, 2016a), the production of this polysaccharide is highly regulated. Previous works of our group showed that the presence of genistein, an effective *nod* gene inducer flavonoid (Vinardell *et al.*, 2004a), caused a decrease of HH103 mucoidy on YMA plates (Vinardell *et al.*, 2004b). In this thesis, we showed that this diminution of mucoidy was due to a reduction of the production of exopolysaccharide (confirmed by quantification

of glucose equivalents and by H-NMR analyses), and that this phenomenon did not take place other in *S. fredii* strains such as USDA257 or NGR234. This negative regulation of EPS production depended both on the ability of the flavonoid to induce *nod* gene expression and on the presence of NodD1, indicating that, in *S. fredii* HH103, the biosynthesis of this polysaccharide is connected with the *nod* regulon. In fact, in previous works we have shown that the *nod* gene repressor NodR has a positive influence on EPS production in HH103. In agreement with the importance of EPS for bacterial biofilms, this reduced EPS production upon treatment with flavonoids correlated with decreased biofilm formation ability. By using quantitative RT-PCR analysis we showed that expression of the *exoY2* and *exoK* genes was repressed in late stationary cultures of *S. fredii* HH103 upon treatment with genistein, being this repression higher in the absence of NodR. Thus, results presented in this work demonstrated that in *S. fredii* HH103 EPS production is regulated just in the opposite way than other bacterial signals such as Nod factors and type 3 secreted effectors: it is repressed by flavonoids and NodD1 and enhanced by the *nod* repressor NodR. These results are in agreement with our previous observations showing that lack of EPS production by *S. fredii* HH103 is not only non-detrimental but even beneficial for symbiosis with soybean. In addition, our results showed how highly close-related bacteria differ in the regulation of their surface polysaccharides: in *S. fredii* NGR234 the presence of flavonoids diminishes the amount of KPS produced and elicits the biosynthesis of a novel type of LPS (Simsek *et al.*, 2009; Ardisson *et al.*, 2011) whereas in HH103 negatively affects EPS production.

Objective 4. The results presented in the corresponding chapter has already been published in Molecular Plant-Microbe Interactions (Acosta-Jurado *et al.*, 2016c. Mol Plant Microbe Interact. 29:700-712).

In rhizobia, control of EPS production is highly complex and involves the participation of numerous regulatory proteins, second messengers like c-di-GMP and quorum-sensing systems. Within regulators, the zinc finger protein MucR enhances EPS production in rhizobia, like *Sinorhizobium meliloti* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, as well as participates in diverse processes in other proteobacteria like *Caulobacter*, *Pseudomonas* or *Brucella* (Janczarek, 2011; Mirabella *et al.*, 2013; Caswell *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). MucR regulates gene expression by binding to palindromic sequences called

mucR boxes. Recent studies have demonstrated that this protein can be considered as a global regulator since is involved in the control of motility, chemotaxis, virulence and even in NF gene expression, depending on the bacterium. The recent sequencing of the *S. fredii* HH103 genome revealed the presence of two copies of *mucR* in this strain, *mucR1* and *mucR2*. In this thesis, we have studied these genes, focusing on their relevance in EPS production and in symbiosis with soybean and *L. burttii*. As it has been recently described of *mucR2* of *S. fredii* CCBAU45436 (Jiao *et al.*, 2016), most probably HH103 MucR2 is not functional due to a frame mutation in its encoding gene. In fact, the HH103 *mucR2* derivative did not exhibit differences with the wild-type strain in any of the bacterial traits analysed in this work. In contrast, inactivation of *mucR1* caused a dramatic reduction of EPS production, confirmed by scoring of mucoidy on YMA plates, H-NMR experiments and glucose equivalents quantification. Unexpectedly, HH103 Δ *mucR1* exhibited a notable increase in its biofilm formation ability, most probably due to increased aggregation in the interphase liquid-air. In addition, extracellular CG production was highly increased in this mutant, most probably as a consequence of the reduction in EPS production. This mutant also showed a drastic reduction in nitrogen-fixation capacity with *G. max* and *L. burttii*. However, in these two legumes, the number of nodules induced by the *mucR1* mutant was significantly increased and decreased respectively with respect to the wild-type strain, indicating that MucR1 can differently affect nodulation depending on the host plant. RNA-Seq analysis carried out in the absence and presence of flavonoids showed that MucR1 controls the expression of hundreds of genes (including some related to motility, EPS production or CG transport), some of them being related to the *nod* regulon. These studies confirmed previous works indicating that in rhizobia MucR is a global regulator that controls numerous processes that can be important in the transition from a free-living to a symbiotic state

References:

Acosta-Jurado, S., Alias-Villegas, C., Navarro-Gómez, P., Zehner, S., Murdoch, P.D., Rodríguez-Carvajal, M.A., Soto, M.J., Ollero F.J., Ruiz-Sainz, J.E., Göttfert, M., Vinardell, J.M. 2016c. The *Sinorhizobium fredii* HH103 MucR1 global regulator is connected with the *nod* regulon and is required for efficient symbiosis with *Lotus burttii* and *Glycine max* cv. Williams. Mol Plant Microbe Interact. 29:700-712.

Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., Murdoch, P. del S., Crespo-Rivas, J.C., Jie, S., Cuesta-Berrio, L., Ruiz-Sainz, J.E., Rodríguez-Carvajal, M.A., Vinardell, J.M. 2016b. Exopolysaccharide production by *Sinorhizobium fredii* HH103 is repressed by genistein in a NodD1-dependent manner. PLoS One. 11:e0160499.

Acosta-Jurado, S., Rodríguez-Navarro, D.N., Kawaharada, Y., Perea, J.F., Gil-Serrano, A., Jin, H., An Q, Rodríguez-Carvajal, M.A., Andersen, S.U., Sandal, N., Stougaard, J., Vinardell, J.M., Ruiz-Sainz, J.E. 2016a. *Sinorhizobium fredii* HH103 invades *Lotus burtii* by crack entry in a nod factor-and surface polysaccharide-dependent manner. Mol Plant Microbe Interact. 29:925-937.

Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., Crespo-Rivas, J.C., Medina, C., Murdoch, P. del S., Cuesta-Berrio, L., Rodríguez-Carvajal, M.A., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M. 2017. The *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103 *rkp-2* region is involved in the biosynthesis of lipopolysaccharide and exopolysaccharide but not in K-antigen polysaccharide production. Plant Soil. doi:10.1007/s11104-017-3268-z.

Ardissone, S., Kobayashi, H., Kambara, K., Rummel, C., Noel, K.D., Walker, G.C., Broughton, W.J., Deakin, W.J. 2011. Role of BacA lipopolysaccharide synthesis, peptide transport, and nodulation by *Rhizobium* sp. Strain NGR234. J. Bacteriol. 193:2218-2228.

Caswell, C.C., Elhassanny, A.E., Planchin, E.E., Roux, C.M., Weeks-Gorospe, J.N., Ficht, T.A., Dunman, P.M., Roop, R.M. 2013. Diverse genetic regulon of the virulence-associated transcriptional regulator MucR in *Brucella abortus* 2308. Infect Immun. 81:1040-51.

Crespo-Rivas, J.C., Margaret, I., Hidalgo, A., Buendía-Clavería, A.M., Ollero, F.J., López-Baena, F.J., del Socorro Murdoch, P., Rodríguez-Carvajal, M.A., Soria-Díaz, M.E., Reguera, M., Lloret, J., Sumpton, D.P., Mosely, J.A., Thomas-Oates, J.E., van Brussel, A.A., Gil-Serrano, A., Vinardell, J.M., Ruiz-Sainz, J.E. 2009. *Sinorhizobium fredii* HH103 *cgs* mutants are unable to nodulate determinate- and indeterminate nodule-forming legumes and overproduce an altered EPS. Mol. Plant Microbe Interact. 22:575–588.

Downie, J.A. 2007. Plant science–infectious heresy. Science 316: 1296–1297.

Downie, J.A. 2010. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol Rev* 34:150-170.

Hidalgo, A., Margaret, I., Crespo-Rivas, J.C., Parada, M., Murdoch, P.S., López, A., Buendía-Clavería, A.M., Moreno, J., Albareda, M., Gil-Serrano, A.M., Rodríguez-Carvajal, M.A., Palacios, J.M., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M. 2010. The *rkpU* gene of *Sinorhizobium fredii* HH103 is required for bacterial K-antigen polysaccharide production and for efficient nodulation with soybean but not with cowpea. *Microbiology*. 156:3398–3411.

Janczarek, M. 2011. Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. *Int. J. Mol. Sci.* 12:7898–7933.

Jiao, J., Wu, L.J., Zhang, B., Hu, Y., Li, Y., Zhang, X.X., Guo, H.J., Liu, L.X., Chen, W.X., Zhang, Z., Tian, C.F. 2016. MucR is required for transcriptional activation of conserved ion transporters to support nitrogen fixation of *Sinorhizobium fredii* in soybean nodules. *Mol Plant Microbe Interact.* 29:352-61.

López-Baena, F.J., Ruiz-Sainz, J.E., Rodríguez-Carvajal, M.A., Vinardell, J.M. 2016. Bacterial molecular signals in the *Sinorhizobium fredii*-soybean symbiosis. *Int. J. Mol. Sci.* 17, E755.

Maekawa, T., Maekawa-Yoshikawa, M., Takeda, N., Imaizumi-Anraku, H., Murooka, Y., Hayashi, H. 2009. Gibberellin controls the nodulation signaling pathway in *Lotus japonicus*. *Plant. J.* 58:183-194.

Margaret, I., Becker, A., Blom, J., Bonilla, I., Goesmann, A., Göttfert, M., Lloret, J., Mittard-Runte, V., Ruiz-Sainz, J. E., Vinardell, J. M., Weidner, S. 2011. Symbiotic properties and first analyses of the genomic sequence of the fast growing model strain *Sinorhizobium fredii* HH103 nodulating soybean. *J. Biotechnol.* 155:11-19.

Margaret-Oliver, I., Lei, W., Parada, M., Rodríguez-Carvajal, M.A., Crespo-Rivas, J.C., Hidalgo, A., Gil-Serrano, A., Moreno, J., Rodríguez-Navarro, D.N., Buendía-Clavería, A., Ollero, J., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M. 2012. *Sinorhizobium fredii* HH103 does not strictly require KPS and/or EPS to nodulate *Glycyrrhiza uralensis*, an indeterminate nodule-forming legume. *Arch. Microbiol.* 194:87–102.

Mirabella, A., Terwagne, M., Zygmunt, M.S., Cloeckert, A., De Bolle, X., and Letesson, J.J. 2013. *Brucella melitensis* MucR, an orthologue of *Sinorhizobium meliloti* MucR, is involved in resistance to oxidative, detergent, and saline stresses and cell envelope modifications. *J. Bacteriol.* 195:453-465.

Parada, M., Vinardell, J.M., Ollero, F.J., Hidalgo, A., Gutiérrez, R., Buendía-Clavería, A.M., Lei, W., Margaret, I., López-Baena, F.J., Gil-Serrano, A.M., Rodríguez-Carvajal, M.A., Moreno, J., Ruiz-Sainz, J.E. 2006. *Sinorhizobium fredii* HH103 mutants affected in capsular polysaccharide (KPS) are impaired for nodulation with soybean and *Cajanus cajan*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 19, 43–52

Rodríguez-Navarro, D.N., Margaret Oliver, I., Albareda Contreras, M. Ruiz-Sainz, J. E. 2011. Soybean interactions with soil microbes, agronomical and molecular aspects. *Agron. Sustain. Dev.* 31:173-190.

Sandal, N., Jin, H., Rodríguez-Navarro, D.N., Temprano, F., Cvitanich, C., Brachmann, A., Sato, S., Kawaguchi, M., Tabata, S., Parniske, M., Ruiz-Sainz, J.E., Andersen, S.U., Stougaard, J. 2012. A set of *Lotus japonicus* Gifu x *L. burtii* recombinant inbred lines facilitates map-based cloning and QTL mapping. *DNA Res.* 19:317-323.

Simsek, S., Ojanen-Reuhs, T., Marie, C., Reuhs, B.L. 2009. An apigenin-induced decrease in K-antigen production by *Sinorhizobium* sp. NGR234 is *y4gM*- and *nodD1*-dependent. *Carbohydr Res.* 344: 1947-1950.

Spaink, H.P., Kondorosi, A., Hooykaas, P.J.J. 1998. The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria. Dordrecht: Kluwer Acad. 566 pp.

Suzaki T., Yoro, E., Kawaguchi, M. 2015. Leguminous plants: inventors of root nodules to accomodate symbiotic bacteria. *klnt Rev Cell Mol Biol.* 316:111-58.

Vinardell, J.M., López-Baena, F.J., Hidalgo, A., Ollero, F.J., Bellogín, R.A., Espuny, M.R., Temprano, F., Romero, F., Krishnan, H.B., Pueppke, S.G., Ruiz-Sainz, J.E. 2004a. The effect of FITA mutations on the symbiotic properties of *S. fredii* varies in a chromosomal-background-dependent manner. *Arch Microbiol.* 181:144-154.

Vinardell, J.M., Ollero, F.J., Hidalgo, Á., López-Baena, F.J., Medina, C., Ivanov-Vangelov, K., Parada, M., Madinabeitia, N., Espuny, M. del R., Bellogín, R. A., Camacho,

M., Rodríguez-Navarro, D.N., Soria-Díaz, M.E., Gil-Serrano, A.M., Ruiz-Sainz, J.E. 2004b. NodR regulates diverse symbiotic signals of *Sinorhizobium fredii* HH103. *Mol Plant Microbe Interact.* 17:676–685.

Vinardell, J.M., Acosta-Jurado, S., Zehner, S., Gottfert, M., Becker, A., Baena, I., Blom, J., Crespo-Rivas, J.C., Goesmanns, A., Jaenickes, S., Krol, E., McIntosh, M., Margaret, I., Pérez-Montaña, F., Schneiker-Bekels, S., Serranias, J., Szczepanowski, R., Buendía, A.M., Lloret, J., Bonilla, I., Pühler, A., Ruiz-Sainz, J.E., Weidner, S. 2015. The *Sinorhizobium fredii* HH103 genome: a comparative analysis with *S. fredii* strains differing in their symbiotic behavior with soybean. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 28:811-824.

Wang, Y., Hay, I.D., Rehman, Z.U., Rehm, B.H. 2015. Membrane-anchored MucR mediates nitrate-dependent regulation of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99:7253-65.

Willems, A. 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil.* 287:3-14.

BIBLIOGRAFÍA

Abarca-Grau, A. M., Burbank, L.P., de Paz, H.D., Crespo-Rivas, J.C., Marco-Noales, E., López, M.M., Vinardell, J.M., von Bodman, S.B., Panyalver, R. 2012. Role for *Rhizobium rhizogenes* K84 cell envelope polysaccharides in Surface interactions. Appl. Environ. Microbiol. 78:1644-1651.

Acosta-Jurado, S., Alias-Villegas, C., Navarro-Gómez, P., Zehner, S., Murdoch, P.D., Rodríguez-Carvajal, M.A., Soto, M.J., Ollero F.J., Ruiz-Sainz, J.E., Göttfert, M., Vinardell, J.M. 2016c. The *Sinorhizobium fredii* HH103 MucR1 global regulator is connected with the *nod* regulon and is required for efficient symbiosis with *Lotus burtii* and *Glycine max* cv. Williams. Mol Plant Microbe Interact. 29:700-712.

Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., Murdoch, P. del S., Crespo-Rivas, J.C., Jie, S., Cuesta-Berrio, L., Ruiz-Sainz, J.E., Rodríguez-Carvajal, M.A., Vinardell, J.M. 2016b. Exopolysaccharide production by *Sinorhizobium fredii* HH103 is repressed by genistein in a NodD1-dependent manner. PLoS One. 11:e0160499.

Acosta-Jurado, S., Rodríguez-Navarro, D.N., Kawaharada, Y., Perea, J.F., Gil-Serrano, A., Jin, H., An Q, Rodríguez-Carvajal, M.A., Andersen, S.U., Sandal, N., Stougaard, J., Vinardell, J.M., Ruiz-Sainz, J.E. 2016a. *Sinorhizobium fredii* HH103 invades *Lotus burtii* by crack entry in a nod factor-and surface polysaccharide-dependent manner. Mol Plant Microbe Interact. 29:925-937.

Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., Crespo-Rivas, J.C., Medina, C., Murdoch, P. del S., Cuesta-Berrio, L., Rodríguez-Carvajal, M.A., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M. 2017. The *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103 *rkp-2* region is involved in the biosynthesis of lipopolysaccharide and exopolysaccharide but not in K-antigen polysaccharide production. Plant Soil. doi:10.1007/s11104-017-3268-z.

Adhya, S., Gottesman, M., Garges, S., Oppenheim, A. 1993. Promoter resurrection by activators--a minireview. Gene. 132:1-6.

Albus, U., Baier, R., Holst, O., Pühler, A., Niehaus, K. 2001. Suppression of an elicitor-induced oxidative burst in *Medicago sativa* cell-cultures by *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides. New Phytologist. 151:597-606.

Amadou, C., Pascal, G., Mangenot, S., Glew, M., Bontemps, C., Capela, D., Carrère, S., Cruveiller, S., Dossat, C., Lajus, A., Marchetti, M., Poinot, V., Rouy, Z., Servin, B., Saad, M., Schenowitz, C., Barbe, V., Batut, J., Médigue, C., Masson-Boivin, C. 2008. Genome sequence of the beta-rhizobium *Cupriavidus taiwanensis* and comparative genomics of rhizobia. *Genome Res.* 18: 1472–1483.

An, J., Carlson, R.W., Glushka, J., Streeter, J.G. 1995. The structure of a novel polysaccharide produced by *Bradyrhizobium* species within soybean nodules. *Carbohydr. Res.* 269:303–317.

Anders, S. y Huber, W. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 11:R106.

Appelbaum, E.R., Thompson, D.V., Idler, K., Chartrain, N. 1988. *Bradyrhizobium japonicum* USDA191 has two *nodD* genes that differ in primary structure and function. *J. Bacteriol.* 170: 12-20.

Ardissone, S., Kobayashi, H., Kambara, K., Rummel, C., Noel, K.D., Walker, G.C., Broughton, W.J., Deakin, W.J. 2011. Role of BacA lipopolysaccharide synthesis, peptide transport, and nodulation by *Rhizobium* sp. Strain NGR234. *J. Bacteriol.* 193:2218-2228.

Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A. E., Ugalde, R., Moreno, E., Morrión, I., Gorvel, J.P. 2005. Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat. Immunol.* 6:618-625.

Armitano, J., Méjean, V., Jourlin-Castelli, C. 2014. Gram-negative bacteria can also form pellicles. *Environ. Microbiol.* 6:534-544.

Bahlawane, C., McIntosh, M., Krol, E., Becker, A. 2008. *Sinorhizobium meliloti* regulator MucR couples exopolysaccharide synthesis and motility. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21:1498–1509.

Baglivo, I., Russo, L., Esposito, S., Malgieri, G., Renda, M., Saluzzo, A., Di Blasio, B., Isernia, C., Fattorusso, R., Pedone, P.V. 2009. Th structural role of the zinc ion can be dispensable in prokaryotic zinc-finger domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106:6933-6938.

Barnett, M. J., Long, S. R. 1990. DNA sequence and translational product of a new nodulation-regulatory locus: *syrM* has sequence similarity to NodD proteins. J. Bacteriol. 172:3695-3700.

Barnett, M.J., Rushing, B.G., Fisher, R.F., Long, S.R. 1996. Transcription start sites for *syrM* and *nodD3* flank an insertion sequence relic in *Rhizobium meliloti*. J Bacteriol. 178:1782–1787.

Barnett, M.J., Swanson, J.A., Long, S.R. 1998. Multiple genetic controls on *Rhizobium meliloti* *syrA*, a regulator of exopolysaccharide abundance. Genetics. 148:19–32.

Barnett, M.J., Toman, C.J., Fisher, R.F., Long, S.R. 2004. A dual-genome symbiosis chip for coordinate study of signal exchange and development in a prokaryote-host interaction. Proc Natl Acad Sci USA. 101:16636–16641.

Barnett, M.J., Long, S.R. 2015. The *Sinorhizobium meliloti* SyrM regulon: effects on global gene expression are mediated by *syrA* and *nodD3*. J Bacteriol. 197:1792-806.

Beck, S., Marlow, V.L., Woodall, K., Doerrler, W.T., James, E.K., Ferguson, G.P. 2008. The *Sinorhizobium meliloti* MsbA2 protein is essential for the legume symbiosis. Microbiology. 154:1258–1270.

Becker, A., Kleickmann, A., Arnold, W., Pühler, A. 1993a. Analysis of the *Rhizobium meliloti* *exoH/exoK/exoL* fragment: ExoK shows homology to excreted endo- β -1,3-1,4-glucanases and ExoH resembles membrane proteins. Mol. Gen. Genet. 238:145–154.

Becker, A., Kleickmann, A., Keller, M., Arnold, W., Pühler, 1993b. A. Identification and analysis of the *Rhizobium meliloti* *exoAMONP* genes involved in exopolysaccharide biosynthesis and mapping of promoters located on the *exoHKLAMONP* fragment. Mol. Gen. Genet. 241:367–379.

Becker, A., Küster, H., Niehaus, K., Pühler, A. 1995a. Extension of the *Rhizobium meliloti* succinoglycan biosynthesis gene cluster: Identification of the *exsA* gene encoding an ABC transporter protein, and the *exsB* gene which probably codes for a regulator of succinoglycan biosynthesis. Mol. Gen. Genet. 249:487–497.

Becker, A., Niehaus, K., Pühler, 1995b. A. Low-molecular-weight succinoglycan is predominantly produced by *Rhizobium meliloti* strains carrying a mutated ExoP protein characterized by a periplasmic N-terminal domain and a missing C-terminal domain. *Mol. Microbiol.* 16:191–203.

Becker, A., Schmidt, M., Jager, W. Puhler, A. 1995c. New gentamicin-resistance and *lacZ* promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. *Gene.* 162:37-39.

Becker, A., Rüberg, S., Küster, H., Roxlau, A.A., Keller, M., Ivashina, T., Cheng, H., Walker, G.C., Pühler, A. 1997. The 32-kilobase *exp* gene cluster of *Rhizobium meliloti* directing the biosynthesis of galactoglucan: Genetic organization and properties of the encoded gene products. *J. Bacteriol.* 179:1375–1384.

Becker, B., Kosch, K., Parniske, M., Müller, P. 1998. Exopolysaccharide synthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: Sequence, operon structure and mutational analysis of an *exo* gene cluster. *Mol. Gen. Genet.* 259:161–171.

Becker, A., Fraysse, N., Sharypova, L. 2005. Recent advances in studies on structure and symbiosis-related function of rhizobial K-antigens and lipopolysaccharides. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 18:899–905.

Becker, A. 2015. Challenges and perspectives in combinatorial assembly of novel exopolysaccharide biosynthesis pathways. *Front Microbiol.* 6:687.

Behringer, J.E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol.* 84:188-198.

Bek, A. S., Sauer, J., Thygesen, M. B., Duus, J. Ø., Petersen, B. O., Thirup, S., James, E., Jensen, K. J., Stougaard, J., Radutoiu, S. 2010. Improved characterization of nod factors and genetically based variation in LysM Receptor domains identify amino acids expendable for nod factor recognition in *Lotus* spp. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23:58-66.

Bender, G. L., Nayudu, M., Le Strange, K.K., Rolfe, B.G. 1988. The *nodD1* gene from *Rhizobium* strain NGR234 is a key determinant in the extension of host range to the nonlegume *Parasponia*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1:259–266.

Bertram-Drogatz, P.A., Rüberg, S., Becker, A. 1997. The regulatory protein MucR binds to a short DNA region located upstream of the *mucR* coding region in *Rhizobium meliloti*. Mol. Gen. Genet. 254:529–538.

Bertram-Drogatz, P.A., Quester, I., Becker, A., Pühler, A. 1998. The *Sinorhizobium meliloti* MucR protein, which is essential for the production of high-molecular-weight succinoglycan exopolysaccharide, binds to short DNA regions upstream of *exoH* and *exoY*. Mol. Gen. Genet. 257:433–441.

Bhagwat, A.A., Tully, R.E. Keister, D.L. 1992. Isolation and characterization of an *ndvB* locus from *Rhizobium fredii*. Mol. Microbiol. 6:2159–2165.

Bhagwat, A.A., Mithöfer, A., Pfeffer, P.E., Kraus, C., Spickers, N., Hotchkiss, A., Ebel, J., Keister, D.L. 1999. Further studies of the role of cyclic β -glucans in symbiosis. An *ndvC* mutant of *Bradyrhizobium japonicum* synthesizes Cyclodecakis-(1 \rightarrow 3)-Glucosyl. Plant Physiol. 119:1057–1064.

Bouhouche, N., Syvanen, M., Kado, C. 2000. The origin of prokaryotic C₂H₂ zinc finger regulators. Trends Microbiol. 8:77-81.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal Biochem 72:248-254.

Breedveld, M.W., Canters Cremers, H.C.J., Batley, M., Posthumus, M.A., Zevenhuizen, L.P.T.M., Wijffelman, C.A., Zehnder, A.J.B. 1993. Polysaccharides synthesis in relation to nodulation behaviour of *Rhizobium leguminosarum*. J. Bacteriol. 175:750–757.

Breedveld, M.W., Miller, K.J. 1994. Cyclic beta-glucans of members of the family *Rhizobiaceae*. Microbiol. Rev. 58:145-161.

Breedveld, M. W., Miller, K. J. 1998. Cell-surface β -glucans. Pages 81-96 in: The Rhizobiaceae. Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria. H. P. Spaink, A. Kondorosi, P. J. J. Hooykaas, eds. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.

Brewin, N.J., 2004. Plant cell wall remodelling in the Rhizobium—legume symbiosis. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 23:293–316.

Broughton, W.J., Jabbouri, S. y Perret, X. 2000. Keys to symbiotic harmony. *J Bacteriol* 182:5641-5652.

Broughton, W.J., Hanin, M., Relić, B., Kopcińska, J., Golinowski, W., Simsek, S., Ojanen-Reuhs, T., Reuhs, B., Marie, C., Kobayashi, H., Bordogna, B., Le Quéré, A., Jabbouri, S., Fellay, R., Perret, X., Deakin, W.J., 2006. Flavonoid-inducible modifications to rhamnan *O*-antigens are necessary for *Rhizobium* sp. strain NGR234-legume symbioses. *J. Bacteriol.* 188:3654–3663.

Buendía-Clavería, A.M., Moussaid, A., Ollero, F.J., Vinardell, J.M., Torres, A., Moreno, J., Gil-Serrano, A.M., Rodríguez-Carvajal, M.A., Tejero-Mateo, P., Peart, J.L., Brewin, N.J., Ruiz-Sainz, J.E. 2003. A *purL* mutant of *Sinorhizobium fredii* HH103 is symbiotically defective and altered in its lipopolysaccharide. *Microbiology.* 149:1807-18.

Caetano-Anolles, G., Gresshoff, P.M., 1991. Plant genetic control of nodulation. *Annu Rev Microbiol.* 45, 345-382.

Calatrava-Morales, N., Nogales, J., Amezttoy, K., van Steenberg, B., Soto, M. 2017. The NtrY/NtrX system of *Sinorhizobium meliloti* GR4 regulates motility, EPS I production, and nitrogen metabolism but is dispensable for symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Plant Microbe Interact.* doi: 10.1094/MPMI-01-17-0021-R.

Campbell, G.R., Reuhs, B.L., Walker, G.C. 2002. Chronic intracellular infection of alfalfa nodules by *Sinorhizobium meliloti* requires correct lipopolysaccharide core. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:3938–3943.

Campbell, G.R.O., Sharypova, L.A., Scheidle, H., Jones, K.M., Niehaus, K.N., Becker, A., Walker, G.C. 2003. Striking complexity of lipopolysaccharides defects in a collection of *Sinorhizobium meliloti* mutants. *J. Bacteriol.* 185:3853–3862.

Capela, D., Barloy-Hubler, F., Gouzy, J., Bothe, G., Ampe, F., Batut, J., Boistard, P., Becker, A., Boutry, M., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Kahn, D., Kiss, E., Lelaure, V., Masuy, D., Pohl, T., Portetelle, D., Pühler, A., Purnelle, B., Ramsperger, U., Renard, C., Thebault, P., Vandenbol, M., Weidner, S., Galibert, F. 2001.

Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:9877-9882.

Caswell, C.C., Elhassanny, A.E., Planchin, E.E., Roux, C.M., Weeks-Gorospe, J.N., Ficht, T.A., Dunman, P.M., Roop, R.M. 2013. Diverse genetic regulon of the virulence-associated transcriptional regulator MucR in *Brucella abortus* 2308. *Infect Immun.* 81:1040-51.

Catoira, R., Timmers, A.C., Maillet, F., Galera, C., Penmetsa, R.V., Cook, D., Dénarié, J., Gough, C. 2001. The HCL gene of *Medicago truncatula* controls *Rhizobium*-induced root hair curling. *Development.* 128:1507–18.

Chen, W., Wang, E., Wang, S., Li, Y., Chen, X., Li, Y. 1995. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slow growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38, 392–397.

Chen, Y.M., Ho, S.C., Lam, S.S., Ho, S.S., Woo, J. L. 2003. Soy isoflavones have a favourable effect on bone loss in Chinese postmenopausal women with lower bone mass: a double-blind, randomized, controlled trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:4740-4747.

Cheng, H.-P., Walker, G.C. 1998. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 180:5183–5191.

Choma, A., Komaniecka, I., Turska-Szewczuk, A., Danikiewicz, W., Spolnik, G. 2012. Structure of lipid A from a stem-nodulating bacterium *Azorhizobium caulinodans*. *Carbohydr. Res.* 352:126-136.

Choma, A., Komaniecka, I., Zebracki, K. 2017. Structure, biosynthesis and function of unusual lipids A from nodule-inducing and N₂-fixing bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 1862:196-209.

Chou, A.Y., Archdeacon, J., Kado, C.I., 1998. *Agrobacterium* transcriptional regulator Ros is a prokaryotic zinc finger protein that regulates the plant oncogene *ipt*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:5293–5298.

Close, T.J., Tait, R.C., Kado, C.I., 1985. Regulation of Ti plasmid virulence genes by a chromosomal locus of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 164:774–781.

Cooley, M.B., Kado, C.I., 1991. Mapping of the *ros* virulence regulatory gene of *A. tumefaciens*. Mol.Gen. Genet. 230:24–27.

Cooper, J.E. 2007. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. J. Appl. Microbiol. 103:1355–1365.

Cren, M., Kondorosi, A., Kondorosi, E. 1994. An insertional point mutation inactivates NodR repressor in *Rhizobium meliloti* 1021. J Bacteriol. 176:518–519.

Cren, M., Kondorosi, A., Kondorosi, E. 1995. NodR controls expression of the *Rhizobium meliloti* nodulation genes involved in the core Nod factor synthesis. Mol Microbiol. 15:733–747.

Crespo-Rivas, J.C., Margaret, I., Hidalgo, A., Buendía-Clavería, A.M., Ollero, F.J., López-Baena, F.J., del Socorro Murdoch, P., Rodríguez-Carvajal, M.A., Soria-Díaz, M.E., Reguera, M., Lloret, J., Sumpton, D.P., Mosely, J.A., Thomas-Oates, J.E., van Brussel, A.A., Gil-Serrano, A., Vinardell, J.M., Ruiz-Sainz, J.E. 2009. *Sinorhizobium fredii* HH103 *cgs* mutants are unable to nodulate determinate- and indeterminate nodule-forming legumes and overproduce an altered EPS. Mol. Plant Microbe Interact. 22:575–588.

Crespo-Rivas, J., Guefrachi, I., Mok, K., Villaécija-Aguilar, J., Acosta-Jurado, S., Pierre, O., Ruiz-Sainz, J., Taga, M., Mergaert, P. Vinardell, J.M. 2015. *Sinorhizobium fredii* HH103 bacteroids are not terminally differentiated and show altered O-antigen in nodules of the Inverted Repeat-Lacking Clade legume *Glycyrrhiza uralensis*. Environ. Microbiol. 18:2392-2404.

D'Antuono, A.L., Casabuono, A., Couto, A., Ugalde, R.A., Lepek, V.C. 2005. Nodule development induced by *Mesorhizobium loti* mutant strains affected in polysaccharide synthesis. Mol. Plant-Microbe Interact. 18:446-457.

D'Antuono, A.L., Ott, T., Krussel, L., Voroshilova, V., Ugalde, R.A., Udvardi, M., Lepek, V.C. 2008. Defects in rhizobial cyclic glucan and lipopolysaccharide synthesis alter legume gene expression during nodule development. Mol. Plant-Microbe Interact. 21:50-60.

D'Haeze, W., Holsters, M. 2004. Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity. *Trends Microbiol.*12:555–561.

D'Haeze, W. Leoff, C., Freshour, G., Noel, K.D., Carlson, R.W. 2007. *Rhizobium etli* CE3 bacteroid lipopolysaccharides are structurally similar but not identical to those produced by cultured CE3 bacteria. *J. Biol. Chem.* 282:17101-17113.

D'Souza-Ault, M. R., Cooley, M. B., Kado, C. I. 1993. Analysis of the Ros repressor of *Agrobacterium virC* and *virD* operons: molecular intercommunication between plasmid and chromosomal genes. *J. Bacteriol.* 175:3486–3490.

Dangel, A.W., Gibson, J.L., Janssen, A.P. Tabita., F.R. 2005. Residues that influence in vivo and in vitro CbbR function in *Rhodobacter sphaeroides* and identification of a specific region critical for co-inducer recognition. *Mol. Microbiol.* 57:1397–1414.

Dazzo, F.B., Truchet, G.L., Hollingsworth, R.I., Hrabak, E.M., Pankratz, H.S., Philip-Hollingsworth, S., Salzwedel, J.L., Chapman, K., Appenzeller, L., Squartini, A., Gerhold, D., Orgambide, G. 1991. *Rhizobium* LPS modulates infection thread development in white clover root hairs. *J. Bacteriol.*173:5371–5384.

Deakin, W.J., Broughton, W.J. 2009. Symbiotic use of pathogenic strategies: Rhizobial protein secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 7:312-320.

De Castro, C., Molinaro, A., Lanzetta, R., Silipo, A., Parrilli, M. 2008. Lipopolysaccharide structures from *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Carbohydr Res* 343:1924–1933.

del Cerro, P., Pérez-Montaña, F., Gil-Serrano, A., López-Baena, F., Megías, M., Hungria, M., Ollero, F. 2017. The *Rhizobium tropici* CIAT 899 NodD2 protein regulates the production of Nod factors under salt stress in a flavonoid-independent manner. *Sci. Rep.* 7:46712.

de Maagd, R.A., Wijffelman, C.A., Pees, E., Lugtenberg, B.J. 1988. Detection and subcellular localization of two Sym plasmid-dependent proteins of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *J. Bacteriol.* 170:4424-4427.

Doherty, D., Leigh, J.A., Glazebrook, J., Walker, G.C. 1988. *Rhizobium meliloti* mutants that overproduce the *R. meliloti* acidic calcofluor-binding exopolysaccharide. J. Bacteriol. 170:4249–4256.

Dong, H., Liu, W., Peng, X., Jing, Z., Wu, Q. 2013. The effects of MucR on expression of type IV secretion system, quorum sensing system and stress responses in *Brucella melitensis*. Vet Microbiol. 166:535-42.

Dowdle, S.F., Bohlool, B.B. 1985. Predominance of fast growing *Rhizobium japonicum* in a soybean field in the People's Republic of China. Appl. Environ. Microbiol. 50:1171-1176.

Downie, J.A. 2007. Plant science–infectious heresy. Science 316: 1296–1297.

Downie, J.A. 2010. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. FEMS Microbiol Rev 34:150-170.

Duelli, D.M., Tobin, A., Box, J.M., Carlson, R.W., Noel, K.D. 2001. Genetic locus required for antigenic maturation of *Rhizobium etli* CE3 lipopolysaccharide. J. Bacteriol. 183, 6054-6064.

Dunn, M.F., Pueppke, A.G., Krishnan, H.B., 1992. The *nod* gene inducer genistein alters the composition and molecular mass distribution of extracellular polysaccharides produced by *Rhizobium fredii* USDA 193. FEMS Microbiol. Lett. 97:107–112.

Dusha, I., Kondorosi, A. 1993. Genes at different regulatory levels are required for the ammonia control of nodulation in *Rhizobium meliloti*. Mol Gen Genet. 240:435–444.

Dusha, I., Austin, S., Dixon, R. 1999. The upstream region of the *nodD3* gene of *Sinorhizobium meliloti* carries enhancer sequences for the transcriptional activator NtrC. FEMS Microbiol Lett. 179:491– 499.

Dylan, T., Ielpi, L., Stanfield, S., Kashyap, L., Douglas, C., Yanofsky, M., Nester, E., Helinski, D. R., Ditta, G. 1986. *Rhizobium meliloti* genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4403-4407.

Dylan, T., Helinski, D.R., Ditta, G.S. 1990. Symbiotic pseudorevertants of *Rhizobium meliloti* ndv mutants. J. Bacteriol. 172:1400–1408.

Ebel, J., Mithöfer, A. 1998. Early events in the elicitation of plant defense. Planta. 206:335–348.

Fauvert, M. y Michiels, J. 2008. Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium-legume symbiosis. FEMS Microbiol Lett. 285:1-9.

Ferguson, G.P., Datta, A., Carlson, R.W., Walker, G.C. 2005. Importance of unusually modified lipid A in *Sinorhizobium* stress resistance and legume symbiosis. Mol. Microbiol. 56:68-80.

Ferguson, G.P., Jansen, A., Marlow, V.L., Walker, G.C. 2006. BacA-mediated bleomycin sensitivity in *Sinorhizobium meliloti* is independent of the unusual lipid A modification. J. Bacteriol. 188:3143-3148.

Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.H., Lin, Y.H., Reid, D.E. Gresshoff, P.M. 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. J Integr Plant Biol. 52: 61–76.

Figurski, D.H., Helinski, D.R. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. Proc Natl Acad Sci USA. 76:1648-1652.

Finan, T.M., Hirsch, A.M., Leigh, J.A., Johansen, E., Kuldau, G.A., Deegan, S., Walker, G.C., Signer, E.R. 1985. Symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti* that uncouple plant from bacterial differentiation. Cell. 40: 869-877.

Finan, T.M., Weidner, S., Womg, K., Buhrmester, J., Chain, P., Vorhölter, F.J., Hernandez-Lucas, I., Becker, A., Cowie, A., Gouzy, J., Golding, B., Pühler, A. 2001. The complete sequence of the 1683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9889–9894.

Fisher, R.F., Egelhoff, T.T., Mulligan, J.T., Long, S.R. 1988. Specific binding of proteins from *Rhizobium meliloti* cell-free extracts containing NodD to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes. Genes Dev. 2:282–293.

Forsberg, L.S., Carlson, R.W. 2008. Structural characterization of the primary *O*-antigenic polysaccharide of the *Rhizobium leguminosarum* 3841 lipopolysaccharide and identification of a new 3-acetimidoylamino-3-deoxyhexuronic acid glycosyl component: a unique *O*-methylated glycan of uniform size, containing 6-deoxy-3-*O*-methyl-D-talose, *n*-acetylquinovosamine, and rhizoaminuronic acid (3-acetimidoylamino-3-deoxy-D-gluco-hexuronic acid). *J. Biol. Chem.* 283:16037–16050.

Fujishige, N.A., Lum, M.R., De Hoff, P.L., Whitelegge, J.P., Faull, K.F., Hirsch, A.M. 2008. *Rhizobium* common nod genes are required for biofilm formation. *Mol Microbiol.* 67: 504-515.

Frayse, N., Couderc, F., Poinot, V. 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the *rhizobium* legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* 270:1365–1380.

Frayse, N., Lindner, B., Kaczynski, Z., Sharypova, L., Holst, O., Niehaus, K., Poinot, V. 2005. *Sinorhizobium meliloti* strain 1021 produces a low-molecular-mass capsular polysaccharide that is a homopolymer of 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid harboring a phospholipid anchor. *Glycobiology.* 15:101–108.

Firdich, E., Whitfield, C. 2005. Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the *Enterobacteriaceae*. *J. Endotoxin. Res.* 11:133–144.

Fumeaux, C., Radhakrishnan, S.K., Ardisson, S., Théraulaz, L., Frandi, A., Martins, D., Nesper, J., Abel, S., Jenal, U., Viollier, P.H. 2014. Cell cycle transition from S-phase to G1 in *Caulobacter* is mediated by ancestral virulence regulators. *Nat Commun.* 5:4081.

Galibert, F., Finan, T.M., Long, S.R., Pühler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M.J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R.W., Dreano, S., Federspiel, N.A., Fisher, R.F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R.W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M.L., Kalman, S., Keating, D.H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M.C., Pohl, T.M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thebault, P., Vandenbol, M., Vorholter, F.J., Weidner, S., Wells, D.H., Wong, K., Yeh, K.C., Batut, J.

2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293, 668–672.

Gay-Fraret, J., Ardisson, S., Kambara, K., Broughton, W.J., Deakin, W.J., Le Quéré, A. 2012. Cyclic β -glucans of *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) sp. strain NGR234 are required for hypo-osmotic adaptation, motility, and efficient symbiosis with host plants. *FEMS Microbiol. Lett.* 333:28–36.

Geiger, O., Weissborn, A.C., Kennedy, E.P. 1991. Biosynthesis and excretion of cyclic glucans by *Rhizobium meliloti* 1021. *J. Bact.* 173:3021-3024.

Ghosh, P. 2004. Process of protein transport by the type III secretion system. *Society* 68: 771–795.

Gibson, K.E., Kobayashi, H., Walker, G.C. 2008. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu Rev Genet.* 42:413-41.

Gil-Serrano, A.M., Rodríguez-Carvajal, M.A., Tejero Mateo, P., Espartero, J.L., Menéndez, M., Corzo, J., Ruiz-Sainz, J.E., Buendía-Clavería, A.M. 1999. Structural determination of a 5-acetamido-3,5,7,9-tetradecoxy-7-(3-hydroxybutyramido)-L-glycero-L-manno-nonulosonic acid-containing homopolysaccharide isolated from *Sinorhizobium fredii* HH103. *Biochem. J.* 342:527–535.

Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, L., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J.C., Jaubert, M., Simon, D., Cartieaux, F., Prin, Y., Bena, G., Hannibal, L., Fardoux, J., Kojadinovic, M., Vuillet, L., Lajus, A., Cruveiller, S., Rouy, Z., Mangenot, S., Segurens, B., Dossat, C., Franck, W.L., Chang, W.S., Saunders, E., Bruce, D., Richardson, P., Normand, P., Dreyfus, B., Pignol, D., Stacey, G., Emerich, D., Verméglio, A., Médigue, C., Sadowsky, M. 2007. Legumes Symbioses: absence of *nod* genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science*. 361:1307-1312.

Glucksmann, M.A., Reuber, T.L., Walker, G.C. 1993a. Family of glycosyl transferases needed for the synthesis of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 175:7033–7044.

Glucksmann, M.A., Reuber, T.L., Walker, G.C. 1993b. Genes needed for the modification, polymerization, export and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*: A model for succinoglycan biosynthesis. J. Bacteriol. 175:7045–7055.

González, V., Santamaría, R.I., Bustos, P., Hernández-González, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., Janga, S.C., Ramírez, M.A., Jiménez-Jacinto, V., Collado-Vides, J., Dávila, G. 2006. The partitioned *Rhizobium etli* genome: Genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103:3834–3839.

Gossmann, J.A., Markmann, K., Brachmann, A., Rose, L.E., Parniske, M. 2012. Polymorphic infection and organogenesis patterns induced by a *Rhizobium leguminosarum* isolate from *Lotus* root nodules are determined by the host genotype. New Phytologist 196: 561–573.

Gray, J.X., Djordjevic, M.A., Rolfe, B.G. 1990. Two genes that regulate exopolysaccharide production in *Rhizobium* sp. strain NGR234: DNA sequences and resultant phenotypes. J. Bacteriol. 172:193–203.

Griffitts, J.S., Long, S.R. 2008. A symbiotic mutant of *Sinorhizobium meliloti* reveals a novel genetic pathway involving succinoglycan biosynthetic functions. Mol Microbiol. 67:1292-1036.

Gudlavalleti, S.K., Forsberg, L.S. 2003. Structural Characterization of the lipid A component of *Sinorhizobium* sp. NGR234 rough and smooth form lipopolysaccharide. Demonstration that the distal amide-linked acyloxyacyl residue containing long chain fatty acid is conserved in *Rhizobium* and *Sinorhizobium* sp. J. Biol. Chem. 278:3957–3968.

Gyaneshwar, P., Hirsch, A.M., Moulin, L., Chen, W.M., Elliott, G.N., Bontemps, C., Estrada de Los Santos, P., Gross, E., Dos Reis, F.B., Sprent, J.I., Young, J.P. y James, E.K. 2011. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. Mol. Plant-Microbe Interact. 24: 1276-1288.

Haag, A.F., Wehmeier, S., Beck, S., Marow, V.L., Fletcher, V., James, E.K., Ferguson, G.P. 2009. The *Sinorhizobium meliloti* LpxXL and AcpXL proteins play important roles in bacteroids development within alfalfa. J. Bacteriol. 191:4681-4686.

Haeze, W.D., Glushka, J., Rycke, R.D., Holsters, M., Carlson, R.W., 2004. Structural characterization of extracellular polysaccharides of *Azorhizobium caulinodans* and importance for nodule initiation on *Sesbania rostrata*. *Mol. Microbiol.* 52:485–500.

Hamilton-Reeves, J.M., Rebello, S.A., Thomas, W., Slaton, J.W., Kurzer, M.S. 2007. Soy protein isolate increases urinary estrogens and the ratio of 2:16alpha-hydroxyestrone in men at high risk of prostate cancer. *J. Nutr.* 137:2258-2263.

Hartman, G.L., West, E.D., Herman, T.K. 2011. Crops that feed the World 2. Soybean- worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Sec.* 3:5-17.

Hashimoto, M., Tanishita, Y., Suda, Y., Murakami, E., Nagata, M., Kucho, K., Abe, M., Uchiumi, T. 2012. Characterization of nitric oxide-inducing lipid A derived from *Mesorhizobium loti* lipopolysaccharide. *Microb. Environ.* 27:490–496.

Hassan, S., Mathesius, U. 2012. The role of flavonoids in root rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *J Exp Bot* 63:3429–3444.

Henikoff, S., Haughn, G.W., Calvo, J.M., Wallace, J. C. 1988. A large family of bacterial activator proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:6602-6606.

Her, G.R., Glazebrook, J., Walker, G.C., Reinhold, V.N. 1990. Structural studies of a novel exopolysaccharide produced by a mutant of *Rhizobium meliloti* strain Rm 1021. *Carbohydr. Res.* 198:305–312.

Hidalgo, A., Margaret, I., Crespo-Rivas, J.C., Parada, M., Murdoch, P.S., López, A., Buendía-Clavería, A.M., Moreno, J., Albareda, M., Gil-Serrano, A.M., Rodríguez-Carvajal, M.A., Palacios, J.M., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M. 2010. The *rkpU* gene of *Sinorhizobium fredii* HH103 is required for bacterial K-antigen polysaccharide production and for efficient nodulation with soybean but not with cowpea. *Microbiology.* 156:3398–3411.

Hölscher, T., Bartels, B., Lin, Y.C., Gallegos-Monterrosa, R., Price-Whelan, A., Kolter, R., Dietrich, L.E., Kovács, A. T. 2015. Motility, chemotaxis and aerotaxis contribute

to competitiveness during bacterial pellicle biofilm development. *J Mol Biol.* 427:3695-708.

Horvath, B., Bachem, C.W., Schell, J., Kondorosi, A. 1987. Host-specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a plant-signal, interacting with the *nodD* gene product. *EMBO J.* 6:841–848.

Hryniewicz, M.M., Kredich, N.M. 1991. The *cysP* promoter of *Salmonella typhimurium*: characterization of two binding sites for CysB protein, studies of in vivo transcription initiation, and demonstration of the anti-inducer effects of thiosulfate. *J. Bacteriol.* 173:5876–5886.

Janczarek, M., Skorupska, A. 2007. The *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* RosR: Transcriptional regulator involved in exopolysaccharide production. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20:867–881.

Janczarek, M., Jaroszuk-Sciseł, J., Skorupska, A. 2009. Multiple copies of *rosR* and *pssA* genes enhance exopolysaccharide production, symbiotic competitiveness and clover nodulation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 96:471-486.

Janczarek, M., Kutkowska, J., Piersiak, T., Skorupska, A. 2010. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosR* is required for interaction with clover, biofilm formation and adaptation to the environment. *BMC Genomics.* 10:284.

Janczarek, M. 2011. Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. *Int. J. Mol. Sci.* 12:7898–7933.

Janczarek, M., Skorupska, A., 2011. Modulation of *rosR* expression and exopolysaccharide production in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* by phosphate and clover root exudates. *Int. J. Mol. Sci.* 12:4132–4155.

Janczarek, M., Rachwał, K., Marzec, A., Grządziel, J., Palusińska-Szys, M. 2015. Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume–rhizobium interactions. *Appl. Soil Ecol.* 85:94-113.

Jarvis, B.D.W., Pankhurst, C.E., Patel, J.J. 1982. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 32:378–380.

Ji, H., Dong, H. 2015. Key steps in type III secretion system (T3SS) towards translocon assembly with potential sensor at plant plasma membrane. Mol. Plant Pathol. 16:762–773.

Jiao, J., Wu, L.J., Zhang, B., Hu, Y., Li, Y., Zhang, X.X., Guo, H.J., Liu, L.X., Chen, W.X., Zhang, Z., Tian, C.F. 2016. MucR is required for transcriptional activation of conserved ion transporters to support nitrogen fixation of *Sinorhizobium fredii* in soybean nodules. Mol Plant Microbe Interact. 29:352–61.

Jiménez-Guerrero, I., Pérez-Montaña, F., Monreal, J.A., Preston, G.M., Fones, H., Vioque, B., Ollero, F.J., López-Baena, F.J. 2015. The *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103 type 3 secretion system suppresses early defense responses to effectively nodulate soybean. Mol. Plant Microbe Interact. 28: 790–799e0142866.

Jofre, E., Becker, A. 2009. Production of succinoglycan polymer in *Sinorhizobium meliloti* is affected by SMb21506 and requires the N-terminal domain of ExoP. Mol. Plant Microbe Interact. 22:1656–1668.

Jones, J.D., Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. Nature. 444: 323–329

Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, M.E., Walker, G.C. 2007. How rhizobial symbionts invade plants: The *Sinorhizobium-Medicago* model. Nat Rev Microbiol. 5:619:33.

Jones, K.M., Sharopova, N., Lohar, D.P., Zhang, J.Q., Van den Bosch, K.A., Walker, G.C. 2008. Differential response of the plant *Medicago truncatula* to its symbiont *Sinorhizobium meliloti* or an exopolysaccharide-deficient mutant. Proc Natl Acad Sci USA. 105:704–709.

Jordan, D.C. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. Int. J. Syst. Bacteriol. 32, 136–139.

Kadmas, J.L., Allaway, D., Studholme, R.E., Sullivan, J.T., Ronson, C.W., Poole, P.S., Raetz, C.R. 1998. Cloning and Overexpression of glycosyltransferases that generate the lipopolysaccharide core of *Rhizobium leguminosarum*. J. Biol. Chem. 273:2799-2807.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M., Tabata, S. 2002. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. DNA Res. 9:189-97.

Kaneko T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M., Tabata, S. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA Res. 7:381-406

Kannenberg, E.L., Reuhs, B.L., Forsberg, L.S., Carlson, R.W., 1998. Lipopolysaccharides and K-antigens: their structures, biosynthesis, and functions. In: Spaink, H.P., Kondorosi, A., Honykaas, P.J.J. (Eds.), The Rhizobiaceae. Kluwer Publishers, pp. 119–154.

Kanenber, E. L., Carlson, R.W. 2001. Lipid A and *O-chain* modifications cause *Rhizobium* lipopolysaccharides to become hydrophobic during bacteroids development. Mol. Microbiol. 39, 379-392.

Kannenberg, E., Carlson, R.W. 2005. An abundance of Nod factors. Chem. Biol. 12:956–958.

Kawaharada, Y., Eda, S., Minamisawa, K., Mitsui, H. 2007. A *Mesorhizobium loti* mutant with reduced glucan content shows defective invasion of its host plant *Lotus japonicus*. Microbiology. 153:3983-3993.

Kawaharada, Y., Kiyota, H., Eda, S., Minamisawa, K., Mitsui, H. 2008. Structural characterization of neutral and anionic glucans from *Mesorhizobium loti*. Carbohydr. Res. 343:2422-2427.

Kawaharada, Y., Kelly, S., Nielsen, M.W., Hjuler, C.T., Gysel, K., Muszyński, A., Carlson, R.W., Thygesen, M.B., Sandal, N., Asmussen, M.H., Vinther, M., Andersen, S.U., Krusell, L., Thirup, S., Jensen, K.J., Ronson, C.W., Blaise, M., Radutoiu, S., Stougaard, J. 2015. Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature*. 523:308-12.

Kawaharada, Y., Nielsen, M.W., Kelly, S., James, E.K., Andersen, K.R., Rasmussen, S.R., Füchtbauer, W., Madsen, L.H., Heckmann, A.B., Radutoiu, S., Stougaard, J. 2017. Differential regulation of the Epr3 receptor coordinates membrane-restricted rhizobial colonization of root nodule primordia. *Nat. Commun.* 8:14534.

Keating, D.H., Willits, M.G., Long, S.R. 2002. A *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant altered in cell surface sulfation. *J Bacteriol.* 184:6681–6689.

Keller, M., Roxlau, A., Wenig, W.M., Schmidt, M., Quandt, J., Niehaus, K., Jording, D., Arnold, W., Pühler, A. 1995. Molecular analysis of the *Rhizobium meliloti mucR* gene regulating the biosynthesis of the exopolysaccharides succinoglycan and galactoglucan. *Mol. Plant Microbe Interact.* 8:267–277.

Kelly, S.J., Muszynski, A., Kawaharada, Y., Hubber, A.M., Sullivan, J.T., Sandal, N., Carlson, R.W., Stougaard, J., Ronson, C.W., 2013. Conditional requirement for exopolysaccharide in the *Mesorhizobium-Lotus* symbiosis. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26:319–329.

Kereszt, A., Kiss, E., Rehus, B.L., Carlson, R.W., Kondorosi, A., Putnoky, P. 1998. Novel *rkp* gene clusters of *Sinorhizobium meliloti* involved in capsular polysaccharide production and invasion of the symbiotic nodule: The *rkpK* gene codes a UDP-glucose dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 180:5426–5431.

Keyser, H.H., Bohlool, B.B., Hu, T.S., Weber, D.F. 1982. Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybean. *Science*. 215:1631-1632.

Kim, W.S. and Krishnan, H.B. 2014. A *nopA* deletion mutant of *Sinorhizobium fredii* USDA257, a soybean symbiont, is impaired in nodulation. *Curr. Microbiol.* 68:239–246.

Kiss, E., Reuhs, B.L., Kim, J.S., Kereszt, A., Petrovics, G., Putnoky, P., Dusha, I., Carlson, R.W., Kondorosi, A. 1997. The *rkpGHI* and *-J* genes are involved in capsular polysaccharide production by *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 179:2132–2140.

Kiss, E., Kereszt, A., Barta, F., Stephens, S., Reuhs, B.L., Kondorosi, A., Putnoky, P. 2001. The *rkp-3* gene region of *Sinorhizobium meliloti* Rm41 contains strain-specific genes that determine K antigen structure. Mol. Plant Microbe Interact. 14:1395–1403.

Kittelberger, R. y Hilbink, F. 1993. Sensitive silver-staining detection of bacterial lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. J. Biochem. Biophys. Methods. 26:81-6.

Kobayashi, H., Naciri-Graven, Y., Broughton, W.J., Perret, X. 2004. Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of *nod-box* controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234. Mol Microbiol. 51:335-47.

Komaniecka, I., Choma, A., Mazur, A., Duda, K.A., Lindner, B., Schwudke, D., Holst O. 2014. Occurrence of an unusual hopanoid-containing lipid A among lipopolysaccharides from *Bradyrhizobium* species. J. Biol. Chem. 289:35644-35655.

Kondorosi, E., Gyuris, J., Schmidt, J., John, M., Duda, E., Hoffmann, B., Schell, J., Kondorosi, A. 1989. Positive and negative control of *nod* gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation. EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J. 8:1331-1340.

Kondorosi, E., Pierre, M., Haumann, U., Buire, M., Hoffmann, B., Schell, J., Kondorosi, 1991. A. Identification of NolR, a negative transacting factor controlling the *nod* regulon in *Rhizobium meliloti*. J Mol Biol. 222:885–896.

Kondorosi, E., Mergaert, P., Kereszt, A. 2013. A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of *Rhizobium* bacteria provoked by host plant factors. Annu Rev Microbiol 67: 611–628.

Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M. Peterson, K. M. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene. 166:175-176.

Krause, A., Doerfel, A., Göttfert, M. 2002. Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Plant Microbe Interact.* 15:1228–1235.

Krishnan, H.B. 2002. NolX of *Sinorhizobium fredii* USDA257, a type III-secreted protein involved in host range determination, is localized in the infection threads of cowpea (*Vigna unguiculata*[L.] Walp) and soybean (*Glycine max*[L.] Merr.) nodules. *J. Bacteriol.* 184:831–839.

Król, J.E., Mazur, A., Marczak, M., Skorupska, A. 2007. Syntenic arrangements of the surface polysaccharide biosynthesis genes in *Rhizobium leguminosarum*. *Genomics* 89:237–247.

Krol, E., Becker, A. 2009. Surface polysaccharides as fitness factors of rhizospheric nitrogen-fixing bacteria. *Bacterial Polysaccharides: Current innovations and future Trends*. M. Ullrich, ed. Caister Academic Press, Norfolk, UK. 189-211.

Kullik, I., M. B. Toledano, L. A. Tartaglia, G., Storz. 1995. Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for oxidation and transcriptional activation. *J. Bacteriol.* 177:1275–1284.

Kuykendall L.D., Saxena B., Devine T.E., Udell S.E. 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov., *Can. J. Microbiol.* 38, 501–505.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.

Lagares, A., Hozbor, D.F., Niehaus, K., Pich Otero, A.J.L., Lorenzen, J., Arnold, W., Pühler, A. 2001. Genetic characterization of a *Sinorhizobium meliloti* chromosomal region involved in lipopolysaccharide biosynthesis, *J. Bacteriol.* 183:1248-1258.

Laus, M., Logman, T., van Brussel, A., Carlson, R., Azadi, P., Gao, M. Kijne, J. 2004. Involvement of *exo5* in production of surface polysaccharides in *Rhizobium leguminosarum* and its role in nodulation of *Vicia sativa* subsp. *nigra*. *J. Bacteriol.* 186:6617-6625.

Le Quere, A.J., Deakin, W.J., Schmeisser, C., Carlson, R.W., Streit, W.R., Broughton, W.J., Forsberg, S. 2006. Structural characterization of a K-antigen capsular polysaccharide essential for normal symbiotic infection in *Rhizobium* sp. NGR234: deletion of the *rkpMNO* locus prevents synthesis of 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradeoxy-non-2-ulosonic acid. J. Biol. Chem. 281:28981–28992.

Lee, S.G., Krishnan, H.B., Jez, J.M. 2014. Structural basis for regulation of rhizobial nodulation and symbiosis gene expression by the regulatory protein NodR. Proc Natl Acad Sci USA. 111:6509-14.

Leigh, A., Signer, E.R. Walker, G.C. 1985. Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:6231-6235.

Lepek, V.C., D'Antuono, A.L., 2005. Bacterial surface polysaccharides and their role in the rhizobia–legume association. Lotus Newslett. 35:93–105.

Lerouge, I., Vanderleyden, J. 2002. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant–microbe interactions. FEMS Microbiol Rev. 26:17–47

Liu, C.W., Murray, J.D. 2016. The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: an update. Plants (Basel). 11,5. pii: E33.

Loh, J., Stacey, G. 2003. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: A unique integration of global regulatory circuits. Appl. Environ. Microbiol. 69:10-17.

Long, S. R. 1996. *Rhizobium* symbiosis: Nod factors in perspective. Plant Cell 8:1885-1898.

López-Baena, F.J., Vinardell, J.M., Pérez-Montaña, F., Crespo-Rivas, J.C., Bellogín, R.A., Espuny, M. del R., Ollero, F.J. 2008. Regulation and symbiotic significance of nodulation outer proteins secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103. Microbiology. 154:1825-36.

López-Baena, F.J., Ruiz-Sainz, J.E., Rodríguez-Carvajal, M.A., Vinardell, J.M. 2016. Bacterial molecular signals in the *Sinorhizobium fredii*-soybean symbiosis. *Int. J. Mol. Sci.* 17, E755.

Machado, D., Pueppke, S.G., Vinardell, J.M., Ruiz-Sainz, J.E., Krishnan, H.B. 1998. Expression of *nodD1* and *nodD2* in *Sinorhizobium fredii*, a nitrogen-fixing symbiont of soybean and other legumes. *Mol Plant Microbe Interact.* 11: 375-382.

Machado, D., Krishnan, H.B. 2003. *nodD* alleles of *Sinorhizobium fredii* USDA 191 differentially influence soybean nodulation, *nodC* expression, and production of exopolysaccharides. *Curr Microbiol.* 47: 134-137.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A. Brock, T. 2015. *Brock Biology of Microorganisms*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall. pp. 514.

Madinabeitia, N., Bellogín, R.A., Buendía-Clavería, A.M., Camacho, M., Cubo, T., Espuny, M.R., Gil-Serrano, A.M., de Lyra, M.C.C., Moussaid, A., Ollero, F.J., Soria-Díaz, M.E., Vinardell, J.M., Zeng, J. y Ruiz-Sainz, J.E. 2002. *Sinorhizobium fredii* HH103 has a truncated *nolO* gene due to a -1 frameshift mutation that is conserved among other geographically distant *S. fredii* strains. *Mol Plant Microbe Interact* 15:150-159.

Madsen, L.N., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J.T., Heckmann, A.B., Bek, A. S., Ronson, C.W., James, E.K., Stougaard, J. 2010. The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat. Commun.* 1:10.

Maekawa, T., Maekawa-Yoshikawa, M., Takeda, N., Imaizumi-Anraku, H., Murooka, Y., Hayashi, H. 2009. Gibberellin controls the nodulation signaling pathway in *Lotus japonicus*. *Plant. J.* 58:183-194.

Maillet, F., Debellé, F., Dénarié, J. 1990. Role of the *nodD* and *syrM* genes in the activation of the regulatory gene *nodD3*, and of the common and host-specific *nod* genes of *Rhizobium meliloti*. *Mol Microbiol.* 4:1975–1984.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, Nueva York (EEUU).

Margaret, I., Becker, A., Blom, J., Bonilla, I., Goesmann, A., Göttfert, M., Lloret, J., Mittard-Runte, V., Ruiz-Sainz, J. E., Vinardell, J. M., Weidner, S. 2011. Symbiotic properties and first analyses of the genomic sequence of the fast growing model strain *Sinorhizobium fredii* HH103 nodulating soybean. *J. Biotechnol.* 155:11-19.

Margaret, I., Crespo-Rivas, J.C., Acosta-Jurado, S., Buendía-Clavería, A.M., Cubo, M.T., Gil-Serrano, A., Moreno, J., Murdoch, P.S., Rodríguez-Carvajal, M.A., Rodríguez-Navarro, D.N., Ruiz-Sainz, J.E., Sanjuán, J., Soto, M.J., Vinardell, J.M. 2012. *Sinorhizobium fredii* HH103 *rkp-3* genes are required for K-antigen polysaccharide biosynthesis, affect lipopolysaccharide structure and are essential for infection of legumes forming determinate nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25:825–838.

Margaret, I., Lucas, M., Acosta-Jurado, S., Buendía-Clavería, A.M., Fedorova, E., Hidalgo, A., Rodríguez-Carvajal, M.A., Rodríguez-Navarro, D.N., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M. 2013. The *Sinorhizobium fredii* HH103 lipopolysaccharide is not only relevant at early soybean nodulation stages but also for symbiosome stability in mature nodules. *PLoS ONE* 8:e74717.

Margaret-Oliver, I., Lei, W., Parada, M., Rodríguez-Carvajal, M.A., Crespo-Rivas, J.C., Hidalgo, A., Gil-Serrano, A., Moreno, J., Rodríguez-Navarro, D.N., Buendía-Clavería, A., Ollero, J., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M. 2012. *Sinorhizobium fredii* HH103 does not strictly require KPS and/or EPS to nodulate *Glycyrrhiza uralensis*, an indeterminate nodule-forming legume. *Arch. Microbiol.* 194:87–102.

Marie, C., Deakin, W. J., Viprey, V., Kopcinska, J., Golinowski, W., Krishnan, H. B., Perret, X., Broughton, W. J. 2003. Characterization of Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. *Mol Plant Microbe Interact.* 16:743–751.

Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., Batut, J. 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *Rhizobium* recipes? *Trends Microbiol.* 17, 458–466.

Mathis, R., van Gijsegem, F., De Rycke, R., D’Haeze, W., Van Maelsaeke, E., Anthonio, E., Van Montagu, M., Holsters, M., Vereecke, D. 2005. Lipopolysaccharides as

a communication signal for progression of legume endosymbiosis. *Proc. Nat. Acad. ci.USA.* 102:2655–2660.

McIntosh, M., Krol, E., Becker, A. 2008. Competitive and cooperative effects in quorum-sensing-regulated galactoglucan biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 190:5308-5317.

McNeil, M., Darvill, J., Darvill, A., Albersheim, P., van Veen, R., Hooykaas, P., Shilperoort, R., Dell, A. 1986. The discernible structural features of the acidic exopolysaccharides secreted by different *Rhizobium* species are the same. *Carbohydr. Res.* 146:307-326.

Meade, H.M. Signer, E.R. 1977. Genetic mapping of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci.USA.* 74:2076-2078.

Meinhardt, L.W., Krishnan, H.B., Balatti, P.A., Pueppke, S.G. 1993. Molecular cloning and characterization of a sym plasmid locus that regulates cultivar-specific nodulation of soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. *Mol. Microbiol.* 9:17–29.

Mendis, H.C., Madzima, T.F., Queiroux, C., Jones, K.M. 2016. Function of succinoglycan polysaccharide in *Sinorhizobium meliloti* host plant invasion depends on succinylation, not molecular weight. *MBio.* 7. pii: e00606-16.

Mesa, S., Hauser, F., Friberg, M., Malaguti, E., Fischer, H. M., Hennecke, H. 2008. Comprehensive assessment of the regulons controlled by the FixLJ-FixK₂-FixK₁ cascade in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 190:6568-6579.

Meyer, F., Goesmann, A., McHardy, A.C., Bartels, D., Bekel, T., Clausen, J., Kalinowski, J., Linke, B., Rupp, O., Giegerich, R., Pühler, A. 2003. GenDB--an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Res.* 31:2187-2195.

Miller, J.H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

Mimmack, M.L., Borthakur, D., Jones, M.A., Downie, J.A., Johnston, A.W. 1994. The *psi* operon of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*: identification of two genes whose products are located at the bacterial cell surface. *Microbiology.* 140: 1223-1229.

Minamisawa, K. 1989. Comparison of extracellular polysaccharide composition, rhizobiotoxine production, and hydrogenase phenotype among various strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Cell Physiol.* 30:877-884.

Mirabella, A., Terwagne, M., Zygmunt, M.S., Cloeckaert, A., De Bolle, X., and Letesson, J.J. 2013. *Brucella melitensis* MucR, an orthologue of *Sinorhizobium meliloti* MucR, is involved in resistance to oxidative, detergent, and saline stresses and cell envelope modifications. *J. Bacteriol.* 195:453-465.

Moreira, L.M., Becker, J.D., Pühler, A., Becker, A. 2000. The *Sinorhizobium meliloti* ExpE1 protein secreted by a type I secretion system involving ExpD1 and ExpD2 is required for biosynthesis or secretion of the exopolysaccharide galactoglucan. *Microbiology.* 136:2237–2248.

Mortier, V., Holsters, M., and Goormachtig, S. 2012. Never too many? How legumes control nodule numbers. *Plant Cell Environ.* 35, 245–258.

Moscatiello, R., Squartini, A., Mariani, P., Navazio, L. 2010. Flavonoid-induced calcium signalling in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*. *New Phytol.* 188:814-23.

Mueller, K., González, J.E. 2011. Complex regulation of symbiotic functions is coordinated by MucR and quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 193:485-496.

Müller, P., Keller, M., Weng, W.M., Quandt, J., Arnold, W., Pühler, A. 1993. Genetic analysis of the *Rhizobium meliloti* *exoYFQ* operon: ExoY is homologous to sugar transferases and ExoQ represents a transmembrane protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* 6:55–65.

Mulligan, J.T., Long, S.R. 1989. A family of activator genes regulates expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Genetics.* 122:7–18.

Muszyński, A., Laus, M., Kijne, J.W., Carlson, R.W., 2011. Structures of the lipopolysaccharides from *Rhizobium leguminosarum* RBL5523 and its UDP-glucose dehydrogenase mutant (*exo5*). *Glycobiology.* 21:55–68.

Muszyński, A., Heiss, C., Hjuler, C.T., Sullivan, J.T., Kelly, S.J., Thygesen, M.B., Stougaard, J., Azadi, P., Carlson, R.W., Ronson, C.W. 2016. Structures of

exopolysaccharides involved in receptor-mediated perception of *Mesorhizobium loti* by *Lotus japonicus*. J Biol Chem. 291:20946-20961.

Nelson, M.S., Sadowsky, M.J. 2015. Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. Front Plant Sci. 6:491.

Netti, F., Malgieri, G., Esposito, S., Palmieri, M., Baglivo, I., Isernia, C., Omichinski, J. G., Pedone, P.V., Lartillot, N., Fattorusso, R. 2013. An experimentally tested scenario for the structural evolution of eukaryotic Cys₂His₂ zinc fingers from eubacterial *ros* homologs. Mol. Biol. Evol. 30:1504-1513.

Niehaus, K., Lagares, A., Pühler, A. 1998. A *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant induces effective nodules on the host plant *Medicago sativa* (alfalfa) but fails to establish a symbiosis with *Medicago truncatula*. Mol Plant Microbe Interact. 11:906–914.

Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67:593-656.

Noel, K.D., Sanchez, A., Fernandez, L., Leemans, J., Cevallos, M.A. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. J. Bacteriol. 158:148–155.

Noel, K.D., van den Bosch, K.A., Kulpaca, B. 1986. Mutation in *Rhizobium phaseoli* that lead to arrested development of infection threads. J. Bacteriol. 168:1392-1401.

Noel, K.D., Duelli, D.M. 2000. *Rhizobium* polysaccharide and its role in symbiosis. In: Triplett, E.W. (Ed.), Prokariotic nitrogen fixation: a model system for analyse of biological process. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, pp.415–431.

O'Neill, M.A., Darvill, A.G., Albersheim, P. 1991. The degree of esterification and points of substitution by *O*-acetyl and *O*-(3hydroxybutanoyl) groups in the acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* biovars *viciae*, *trifolii*, and *phaseoli* are not related to host range. J. Biol. Chem. 266:9549-9555.

O'Toole, G.A., Kolter, R. 1998. Initiation of *biofilm* formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol.* 28: 449–461.

Oka-Kira, E., Kawaguchi, M., 2006. Long-distance signaling to control root nodule number. *Curr Opin Plant Biol.* 9, 496-502.

Oldroyd, G.E., Downie, J.A. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol.* 59:519-46.

Oldroyd, G. 2013. Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature* 11:252-263.

Oliveira, L.R., Rodrigues, E.P., Marcelino-Guimarães, F.C., Oliveira, A.L., Hungria, M. 2013. Fast induction of biosynthetic polysaccharide genes *lpxA*, *lpsE*, and *rkpI* of *Rhizobium* sp. strain PRF 81 by common bean seed exudates is indicative of a key role in symbiosis. *Funct. Integr. Genom.* 13:275-283.

Pallen, M.J., Chaudhuri, R.R., Henderson, I.R. 2003. Genomic analysis of secretion systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 519–527

Pálvölgyi, A., Deák, V., Poinso, V., Nagy, T., Nagy, E., Kerepesi, I., Putnoky, P. 2009. Genetic analysis of the *rkp-3* gene region in *Sinorhizobium meliloti* 41: *rkpY* directs capsular polysaccharide synthesis to K_{R5} antigen production. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22:1422–1430.

Parada, M., Vinardell, J.M., Ollero, F.J., Hidalgo, A., Gutiérrez, R., Buendía-Clavería, A.M., Lei, W., Margaret, I., López-Baena, F.J., Gil-Serrano, A.M., Rodríguez-Carvajal, M.A., Moreno, J., Ruiz-Sainz, J.E. 2006. *Sinorhizobium fredii* HH103 mutants affected in capsular polysaccharide (KPS) are impaired for nodulation with soybean and *Cajanus cajan*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 19, 43–52

Parsek, M.R., Kivisaar, M., Chakrabarty A.M. 1995. Differential DNA bending introduced by the *Pseudomonas putida* LysR-type regulator, CatR at the plasmid-borne *pheBA* and chromosomal *catBC* promoters. *Mol. Microbiol.* 15:819–828.

Peck, M.C., Fisher, R.F., Long, S.R. 2006. Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to *nod* gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. J Bacteriol. 188:5417-27.

Peck, M.C., Fisher, R.F., Bliss, R., Long, S.R. 2013. Isolation and characterization of mutant *Sinorhizobium meliloti* NodD1 proteins with altered responses to luteolin. J. Bacteriol. 195:3714–3723.

Peix, A., Ramírez-Bahena M.H., Velázquez E., Bedmar E.J. 2015. Bacterial Associations with Legumes. Crit. Rev. Plant Sci. 34:17-42.

Pellock, B.J., Cheng, H.P., Walker, G.C. 2000. Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. J. Bacteriol. 182:4310–4318.

Pérez-Mendoza, D., Rodríguez-Carvajal, M.A., Romero-Jiménez, L., Farias, G. de A., Lloret, J., Gallegos, M.T. Sanjuán, J. 2015. Novel mixed-linkage β -glucan activated by c-di-GMP in *Sinorhizobium meliloti*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 112:E757-765.

Pérez-Montaña, F., Jiménez-Guerrero, I., Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., Ollero, F.J., Ruiz-Sainz, J.E., López-Baena, F.J., Vinardell, J.M. 2016. A transcriptomic analysis of the effect of genistein on *Sinorhizobium fredii* HH103 reveals novel rhizobial genes putatively involved in symbiosis. Sci. Rep. 6:31592.

Perret, X., Freiberg, C., Rosenthal, A., Broughton, W.J., Fellay, R. 1999. High-resolution transcriptional analysis of the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. Mol. Microbiol. 32:415–425.

Peters, N.K., Frost, J.W., Long, S.R. 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Science. 233: 977-980.

Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res. 30:e36.

Philip-Hollingsworth, S., Hollingsworth, R.I., Dazzo, F.B. 1989. Host-range related structural features of the acidic extracellular polysaccharides of *Rhizobium trifolii* and *Rhizobium leguminosarum*. J. Biol. Chem. 264:1461-1466.

Poveda, A., Santamaria, M., Bernabe, M., Prieto, A., Briux, M., Corzo, J., Jimenez-Barbero, J. 1997. Studies on the structure and the solution conformation of an acidic extracellular polysaccharide isolated from *Bradyrhizobium*. Carbohydr. Res. 304:209–217.

Price, N.P.J., Kelly, T.M. Raetz, C.R.H. Carlson, R.W. 1994. Biosynthesis of a structurally novel lipid A in *Rhizobium leguminosarum*: identification and characterization of six metabolic steps leading from UDP-GlcNAc to 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid-2 lipid IVA. J. Bacteriol. 176:4646-4655.

Pueppke, S.G., Broughton, W.J. 1999. *Rhizobium* sp. Strain NGR234 y *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. Mol. Plant-Microbe Interact. 12:293-318.

Putnoky, P., Grosskopf, E., Cam Ha, D.T., Kiss, G.B., Kondorosi, A. 1988. *Rhizobium fix* genes mediate at least two communication steps in symbiotic nodule development. J. Cell Biol. 106:597–607.

Putnoky, P., Petrovics, G., Kereszt, A., Grosskopf, E., Ha, D.T., Banfalvi, Z., Kondorosi, A. 1990. *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide and exopolysaccharide can have the same function in the plant-bacterium interaction. J. Bacteriol. 172, 5450-5458.

Puvanesarajah, V., Schell, F., Gerhold, D., Stacey, G. 1987. Cell surface polysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum* and a non nodulating mutant. J. Bacteriol. 169:137-141.

Que, N.L.S., Lin, S.H., Cotter, R.J., Raetz, C.H.R. 2000. Purification and mass spectrometry of six lipid A species from the bacterial endosymbiont *Rhizobium etli*. Demonstration of a conserved distal unit and a variable proximal portion. J. Biol. Chem. 275:28006–28016.

Quelas, J.I., Mongiardini, E.J., Casabuono, A., López-García, S.L., Althabegoiti, M.J., Covelli, J.M. Pérez-Giménez, J., Couto, A., Lodeiro, A.R. 2010. Lack of galactose or galacturonic acid in *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 exopolysaccharide leads to different symbiotic responses in soybean. Mol Plant Microbe Interact. 23: 1592-1604.

Rachwał, K., Matczyńska, E., Janczarek M. 2015. Transcriptome profiling of a *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii *rosR* mutant reveals the role of the transcriptional regulator RosR in motility, synthesis of cell-surface components, and other cellular processes. BMC Genomics. 16:1111.

Raetz, C.R., Reynolds, C.M., Trent, M.S., Bishop, R.E. 2007. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. Ann. Rev. Biochem. 76:295–329.

Reed, J.W., Glazebrook, J., Walker, G.C. 1991. The *exoR* gene of *Rhizobium meliloti* affect RNA levels of other *exo* genes but lacks homology to known transcriptional regulators. J. Bacteriol. 173:3789–3794.

Reed, J.W., Walker, G.C. 1991. The *exoD* gene of *Rhizobium meliloti* encodes a novel function needed for alfalfa nodule invasion. J. Bacteriol. 173:664–677.

Reeve, W., O'Hara, G., Chain, P., Ardley, J., Bräu, L., Nandesena, K., Tiwari, R., Copeland, A., Nolan, M., Han, C., Brettin, T., Land, M., Ovchinikova, G., Ivanova, N., Mavromatis, K., Markowitz, V., Kyrpides, N., Melino, V., Denton, M., Yates, R., Howieson, J. 2010a. Complete genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain WSM1325, an effective microsymbiont of annual Mediterranean clovers. Stand. Genomic Sci. 2:347–356.

Reeve, W., O'Hara, G., Chain, P., Ardley, J., Bräu, L., Nandesena, K., Tiwari, R., Malfatti, S., Kiss, H., Lapidus, A., Copeland, A., Nolan, M., Land, M., Ivanova, N., Mavromatis, K., Markowitz, V., Kyrpides, N., Melino, V., Denton, M., Yates, R., Howieson, J. 2010b. Complete genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain WSM2304, an effective microsymbiont of the South American clover *Trifolium polymorphum*. Stand. Genomic Sci. 2:66-76.

Reinhold, B.B., Chan, S.Y., Reuber, T.L., Marra, A., Walker, G.C., Reinhold, V.N. 1994. Detailed structural characterization of succinoglycan, the major exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* Rm 1021. J. Bacteriol. 176:1997–2002.

Remigi, P., Zhu, J., Young, J.P., Masson-Boivin, C. 2016. Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen-Fixing Legume Symbionts. Trends Microbiol. 24:63-75.

Reuber, T.L., Walker, G.C. 1993. Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Cell* 74:269–280.

Reuhs, B.L., Carlson, R.W., Kim, J.S. 1993. *Rhizobium fredii* and *Rhizobium meliloti* produce 3-deoxy-D-manno-2-octulosonicacid-containing polysaccharides that are structurally analogous to group II K antigens (capsular polysaccharides) found in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175:3570–3580.

Reuhs, B.L., Williams, M.N., Kim, J.S., Carlson, R.W., Cote, F. 1995. Suppression of the Fix phenotype of *Rhizobium meliloti* *exoB* mutants by *lpsZ* is correlated to a modified expression of the K polysaccharide. *J. Bacteriol.* 177:4289–4296.

Reuhs, B.L., Geller, D.P., Kim, S., Fox, J.F., Kolli, V.S.K., Pueppke, S.G., 1998. *Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium meliloti* produce structurally conserved lipopolysaccharides and strain-specific K antigens. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4930–4938.

Reuhs, B.L., Relic, B., Fosberg, L.S., Marie, C., Ojanen-Reuhs, T., Stephens, S.B., Wong, C., Jaboouri, S., Broughton, W.J. 2005. Structural characterization of a flavonoid-inducible *Pseudomonas aeruginosa* A-band-like O-antigen of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *J. bacterial.* 187, 6479–6487.

Rhee, K.Y., Senear, D.F., Hatfield, G.W. 1998. Activation of gene expression by a ligand-induced conformational change of a protein-DNA complex. *J. Biol. Chem.* 273:11257–11266. *Rhizobiaceae*. *Microbiol. Rev.* 58:145–165.

Rice, P., Longden, I., Bleasby, A. 2000. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* 16:276–277.

Rigano, L.A., Payette, C., Brouillard, G., Marano, M.R., Abramowicz, L., Torres, P.S., Yun, M., Castagnaro, A.P., El Oirdi, M., Dufour, V., Malamud, F., Dow, J.M., Bouarab, K., Vojnov, A.A. 2007. Bacterial cyclic β -(1,2)-glucan acts in systemic suppression of plant immune responses. *Plant Cell.* 19:2077–2089.

Rinaudi, L.V., Giordano, W. 2010. An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* 304:1–11.

Robertson, B.K., Aman, P., Darvill, A.G., McNeil, M., Albersheim, P. 1981 Host-symbiont interactions. The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiol.* 67:389-400.

Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 26:139–140.

Rodríguez-Carvajal, M.A., Tejero-Mateo, P., Espartero, J.L., Ruiz-Sainz, J.E., Buendía-Clavería, A.M., Ollero, F.J., Yang, S.S. y Gil-Serrano, A.M. 2001. Determination of the chemical structure of the capsular polysaccharide of strain B33, a fast-growing soybean-nodulating bacterium isolated from an arid region of China. *Biochem. J.* 357:505-511.

Rodríguez-Navarro, D.N., Margaret Oliver, I., Albareda Contreras, M. Ruiz-Sainz, J. E. 2011. Soybean interactions with soil microbes, agronomical and molecular aspects. *Agron. Sustain. Dev.* 31:173-190.

Rodríguez-Navarro, D.N., Rodríguez-Carvajal, M.A., Acosta-Jurado, S., Soto, M.J., Margaret, I., Crespo-Rivas, J.C., Sanjuan, J., Temprano, F., Gil-Serrano, A., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M. 2014. Structure and biological roles of *Sinorhizobium fredii* HH103 exopolysaccharide. *PLoS ONE* 9: e115391.

Rolfe, B.G., Carlson, R.W., Ridge, R.W., Dazzo, R.W., Mateos, F.B., Pankhurst, C.E. 1996. Defective infection and nodulation of clovers by exopolysaccharide mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Aust. J. Plant Physiol.* 23, 285–303.

Rosell, M.S., Appleby, P.N., Spencer, E.A., Key, T.J. 2004. Soy intake and blood cholesterol considerations: a cross-seccional study of 1033 pre- and postmenopausal women in the oxford arm of the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 80:1391-1396.

Rostas, K., Kondorosi, E., Horvath, B., Simoncsits, A., Kondorosi, A. 1986. Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:1757–1761.

Rüberg, S., Pühler, A., Becker, A. 1999. Biosynthesis of the exopolysaccharide galactoglucan in *Sinorhizobium meliloti* is subject to a complex control by the phosphate-dependent regulator PhoB and the proteins ExpG and MucR. *Microbiology*. 145:603–611.

Sadykov, M.R., Ivashina, T.V., Kanapin, A.A., Shlyapnikov, M.G., Ksenzenko, V.N. 1998. Structural and functional organization of the exopolysaccharide biosynthesis genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39. *Mol. Biol.* 32:665–671.

Saiki, R.K. 1990. Amplification of genomic DNA. En *PCR Protocols. A guide of methods and applications*, Editores: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. y White, T.J. Academic Press Inc., (EEUU). pp. 13-20.

Saldaña, G., Martínez-Alcántara, V., Vinardell, J.M., Bellogín, R., Ruíz-Sainz, J.E., Balatti, P.A. 2003. Genetic diversity of fast-growing rhizobia that nodulate soybean (*Glycine max* L. Merr). *Arch Microbiol.* 180:45-52.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, Nueva York (EEUU).

Sambrook, J., Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, (EEUU).

Sandal, N., Jin, H., Rodríguez-Navarro, D.N., Temprano, F., Cvitanich, C., Brachmann, A., Sato, S., Kawaguchi, M., Tabata, S., Parniske, M., Ruiz-Sainz, J.E., Andersen, S.U., Stougaard, J. 2012. A set of *Lotus japonicus* Gifu x *L. burtii* recombinant inbred lines facilitates map-based cloning and QTL mapping. *DNA Res.* 19:317-323.

Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. y Pühler, A. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*. 145:69-73.

Schäper, S., Krol, E., Skotnicka, D., Kaeffer, V., Hilker, R., Sørensen-Andersen, L., Becker, A. 2015. Cyclic di-GMP regulates multiple cellular functions in the symbiotic alphaproteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 198:521-535.

Schäper, S., Steinchen, W., Krol, E., Altegoer, F., Skotnicka, D., Søgaaard-Andersen, L., Bange, G., Becker, A. 2017. AraC-like transcriptional activator CuxR binds c-di-GMP by a PilZ-like mechanism to regulate extracellular polysaccharide production. *Proc Natl Acad Sci USA*. doi: 10.1073/pnas.1702435114.

Scheidle, H., Groß, A., Niehaus, K. 2005. The lipid A substructure of the *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharide is sufficient to suppress the oxidative burst in host plants. *New Phytol.* 165:559–566.

Schell, M.A. 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:595–626.

Schlaman, H.R.M., Phillips, D.A., Kondorosi, E. 1998. Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. In *The Rhizobiaceae*, ed. HP Spaink, A Kondorosi, PJJ Hooykaas, pp. 361–86. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Acad.

Schmeisser, C., Liesegang, H., Krysiak, D., Bakkou, N., Le Quéré, A., Wollherr, A., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Pommerening-Röser, A., Flores, M., Palacios, R., Brenner, S., Gottschalk, G., Schmitz, R.A., Broughton, W.J., Perret, X., Strittmatter, A.W., Streit, W.R. 2009. *Rhizobium* sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4035–4045.

Schue, M., Fekete, A., Ortet, P., Brutesco, C., Heulin, T., Schmitt-Kopplin, P., Achouak, W., Santaella, C., 2011. Modulation of metabolism and switching to biofilm prevail over exopolysaccharide production in the response of *Rhizobium alamii* to cadmium. *PLoS One* 6:11.

Silipo, A., De Castro, C., Lanzetta, R., Molinaro, A., Parrilli, M. 2004. Full structural characterization of the lipid A components from the *Agrobacterium tumefaciens* strain C58 lipopolysaccharide fraction. *Glycobiology* 14 :805–815.

Silipo, A., Vitiello, G., Gully, D., Sturiale, L., Chaintreuil, C., Fardoux, J., Gargani, D., Lee, H., I, Kulkarni, G., Busset, N., Marchetti, R., Palmigiano, A., Moll, H., Engel, R., Lanzetta, R., Paduano, L., Parrilli, M., Chang, W.S., Holst, O., Newman, D.K., Garozzo, D., D'Errico, G., Giraud, E., Molinaro. 2014. A Covalently linked hopanoid-lipid A improves

outer membrane resistance of a *Bradyrhizobium* symbiont of legumes. *at. Commun.* 5:5106.

Simsek, S., Ojanen-Reuhs, T., Marie, C., Reuhs, B.L. 2009. An apigenin-induced decrease in K-antigen production by *Sinorhizobium* sp. NGR234 is *y4gM*- and *nodD1*-dependent. *Carbohydr Res.* 344: 1947-1950.

Skorupska, A., Janczarek, M., Marczak, M., Mazur, A., Król, J. 2006. Rhizobial exopolysaccharides: Genetic control and symbiotic functions. *Microb. Cell Fact.* 5:7.

Smith, D., Johnson, K. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Eschericia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene.* 67:31-40.

Sorroche, F.G., Spesia, M. B., Zorreguita, A., and Giordano, W. 2012. A positive correlation between bacterial autoaggregation and biofilm formation in native *Sinorhizobium meliloti* isolates from Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:4092-4101.

Soto, M.J., Sanjuán, J., Olivares, J. 2006. Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology.* 152:3167-3174.

Sourjik, V., Schmitt, R. 1996. Different roles of CheY1 and CheY2 in the chemotaxis of *Rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* 22:427-436.

Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 98:503-517.

Spaink, H.P., Wijffelman, C.A., Pees, E., Okker, R.J.H., Lugtenberg, B.J.J. 1987. *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature.* 328:337–40.

Spaink, H.P., Kondorosi, A., Hooykaas, P.J.J. 1998. The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria. Dordrecht: Kluwer Acad. 566 pp.

Spaink, H.P. 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 54:257-88.

Sprent, J.I. 2007. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytol* 174: 11-25.

Stacey, G. 1991. A lipopolysaccharide mutant of *Bradyrhizobium japonicum* that uncouples plant from bacterial differentiation. *Mol Plant Microbe Interact.* 4:332.

Staehelin, C., Forsberg, L.S., D’Haeze, W., Gao, M.Y., Carlson, R.W., Xie, Z.P., Pellock, B.J., Jones, K.M., Walker, G.C., Streit, W.R., Broughton, W.J. 2006. Exo-oligosaccharides of *Rhizobium* sp. strain NGR234 are required for symbiosis with various legumes. *J. Bacteriol.* 188:6168–6178.

Staehelin, C., Krishnan, H.B. 2015. Nodulation outer proteins: double-edged swords of symbiotic rhizobia. *Biochem J.* 470:263-74.

Studier, F.W., Moffatt, B.A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189: 113-130.

Sugawara, M., Epstein, B., Badgley, B., Unno, T., Xu, L., Reese, J., Gyaneshwar, P., Denny, R., Mudge, J., Bharti, A., Farmer, A., May, G., Woodward, J., Médigue, C., Vallenet, D., Lajus, A., Rouy, Z., Martinez-Vaz, B., Tiffin, P., Young, N., Sadowsky, M. 2013. Comparative genomics of the core and accessory genomes of 48 *Sinorhizobium* strains comprising five genospecies. *Genome Biology.* 14:p.R17.

Sugawara, M., Sadowsky, M.J. 2014. Enhanced nodulation and nodule development by *nolR* mutants of *Sinorhizobium medicae* on specific *Medicago* host genotypes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4:328-335.

Sullivan, J.T., Patrick, H.N., Lowther, W.L., Scott, D.B., Ronson, C.W. 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:8985-8989.

Sullivan, J.T., Ronson, C.W. 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:5145-5149.

Suzaki T., Yoro, E., Kawaguchi, M. 2015. Leguminous plants: inventors of root nodules to accomodate symbiotic bacteria. *klnt Rev Cell Mol Biol.* 316:111-58.

Swanson, J.A., Mulligan, J.T., Long, S.R. 1993. Regulation of *syrM* and *nodD3* in *Rhizobium meliloti*. *Genetics.* 134:435-444.

Tampakaki, A.P. 2014. Commonalities and differences of T3SSs in rhizobia and plant pathogenic bacteria. *Front. Plant Sci.* 5:114.

Theunis, M., Kobayashi, H., Broughton, W.J., Prinsen, E. 2004. Flavonoids, NodD1, NodD2, and *nod box* NB15 modulate expression of the *y4wEFG* locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 17:1153–1161.

Thomas-Oates, J., Bereszcak, J., Edwards, E., Gill, A., Noreen, S., Zhou, J.C., Chen, M.Z., Miao, L.H., Xie, F.L., Yang, J.K., Zhou, Q., Yang, S.S., Li, X.H., Wang, L., Spaink, H.P., Schlaman, H.R., Harteveld, M., Díaz, C.L., van Brussel, A.A., Camacho, M., Rodríguez-Navarro, D.N., Santamaría, C., Temprano, F., Acebes, J.M., Bellogín, R.A., Buendía-Clavería, A.M., Cubo, M.T., Espuny, M.R., Gil, A.M., Gutiérrez, R., Hidalgo, A., LópezBaena, F.J., Madinabeitia, N., Medina, C., Ollero, F.J., Vinardell, J.M., Ruiz-Sainz, J.E. 2003. A catalogue of molecular, physiological and symbiotic properties of soybean-nodulating rhizobial strains from different soybean cropping areas of China. *Syst Appl Microbiol.* 26:453–465.

Tiburtius, A., De Luca, N.G., Hussain, H., Johnston, A.W.B. 1996. Expression of the *exoY* gene, required for exopolysaccharide synthesis in *Agrobacterium*, is activated by the regulatory *ros* gene. *Microbiology.* 142:2621–2629.

Toledano, M., Kullik, I., Trinh, F., Baird, P., Schneider, T., Storz, G. 1994. Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: A mechanism for differential promoter selection. *Cell.* 78:897-909.

Townsend, G.E., Forsberg, L.S., Keating, D.H. 2006. *Mesorhizobium loti* produces *nodPQ*-dependent sulfated cell surface polysaccharides. *J. Bacteriol.* 188:8560–8572.

Townsend, G.E., Keating, D.H. 2008. Identification and characterization of KpsS, a novel polysaccharide sulphotransferase in *Mesorhizobium loti*. *Mol. Microbiol.* 68:1149–1164.

Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M.J., Salzberg, S.L., Wold, B.J., Pachter, L. 2010. Transcript assembly and quantification by

RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol.* 28:511-5.

Trinick, M.J. 1980. Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* sp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. *J. Appl. Bacteriol.* 49:39–53.

Tseng, T.T., Tyler, B.M., Setubal, J.C. 2009. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol.* 9(Suppl. 1): S2.

Turner, G.L., Gibson, A.H. 1980. Measurements of nitrogen fixation by indirect means. *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. Pp. 111-133. F.J. Bergensen (ed). John Wiley and sons. Chichester, New York, USA.

Ugalde, R.A. 1999. Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. *Microbes Infect.* 1:1211-1219.

Uttaro, A.D., Cangelosi, G.A., Geremia, R.A., Nester, E.W., Ugalde, R.A. 1990. Biochemical characterization of avirulent *exoC* mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 172:1640–1646.

van Brussel, A.A.N., Planque, K., Quispel, A. 1977. The Wall of *Rhizobium leguminosarum* in bacteroid and free-living forms. *J. Gen. Microbiol.* 101:51-56.

van Rhijn, P.J.S., Feys, B, Verreth, C., Vanderleyden, J. 1993. Multiple copies of *nodD* in *Rhizobium tropici* CIATS99 and BRS1. *Bacteriol.* 175:438-447.

van Workum, W.A., Canter Cremers, H.C.J., Wijfjes, A.H.M., van der Kolk, C., Wijffelman, C.A., Kijne, J.W. 1997. Cloning and characterization of four genes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* involved in exopolysaccharide production and nodulation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10:290–301.

Vanderlinde, E.M., Harrison, J.J., Muszyński, A., Carlson, R.W., Turner, R.J., Yost, C.K. 2010. Identification of a novel ABC transporter required for desiccation tolerance,

and biofilm, formation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* 3841. FEMS Microbiol. Ecol. 71:327-340.

Vedam, V., Haynes, J.G., Kannenberg, E.L., Carlson, R.W., Sherrier, D.J. 2004. A *Rhizobium leguminosarum* lipopolysaccharide lipid A mutant induces nitrogen-fixing nodules with delayed and defective bacteroid formation. Mol Plant Microbe Interact. 17:283–291.

Vinardell, J.M., Fedorova, E., Cebolla, A., Kevei, Z., Horvath, G., Kelemen, Z., Tarayre, S., Roudier, F., Mergaert, P., Kondorosi, A., Kondorosi, E. 2003. Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. Plant Cell. 15:2093-2105.

Vinardell, J.M., López-Baena, F.J., Hidalgo, A., Ollero, F.J., Bellogín, R.A., Espuny, M.R., Temprano, F., Romero, F., Krishnan, H.B., Pueppke, S.G., Ruiz-Sainz, J.E. 2004b. The effect of FITA mutations on the symbiotic properties of *S. fredii* varies in a chromosomal-background-dependent manner. Arch Microbiol. 181:144-154.

Vinardell, J.M., Ollero, F.J., Hidalgo, Á., López-Baena, F.J., Medina, C., Ivanov-Vangelov, K., Parada, M., Madinabeitia, N., Espuny, M. del R., Bellogín, R. A., Camacho, M., Rodríguez-Navarro, D.N., Soria-Díaz, M.E., Gil-Serrano, A.M., Ruiz-Sainz, J.E. 2004a. NolR regulates diverse symbiotic signals of *Sinorhizobium fredii* HH103. Mol Plant Microbe Interact. 17:676–685.

Vinardell, J.M., Acosta-Jurado, S., Zehner, S., Gottfert, M., Becker, A., Baena, I., Blom, J., Crespo-Rivas, J.C., Goesmanns, A., Jaenickes, S., Krol, E., McIntosh, M., Margaret, I., Pérez-Montaña, F., Schneiker-Bekels, S., Serranias, J., Szczepanowski, R., Buendía, A.M., Lloret, J., Bonilla, I., Pühler, A., Ruiz-Sainz, J.E., Weidner, S. 2015. The *Sinorhizobium fredii* HH103 genome: a comparative analysis with *S. fredii* strains differing in their symbiotic behavior with soybean. Mol. Plant-Microbe Interact. 28:811-824.

Vincent, J.M. 1970. Appendix III. The modified Fåhræus slide technique. In Vincent JM, editor. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Oxford, UK. Blackwell Scientific. pp 144–145.

Viprey, V., del Greco, A., Golinowski, W., Broughton, W.J., Perret, X. 1998. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol Microbiol.* 28:1381–1389.

Wang, D., Yang, S., Tang, F., y Zhu, H. 2012. Symbiosis specificity in the legume-rhizobial mutualism. *Cell Microbiol* 14: 334–342.

Wang, L., Helmann, J.D., Winans, S. C. 1992. The *A. tumefaciens* transcriptional activator OccR causes a bend at a target promoter, which is partially relaxed by a plant tumor metabolite. *Cell.* 69:659–667.

Wang, Y., Hay, I.D., Rehman, Z.U., Rehm, B.H. 2015. Membrane-anchored MucR mediates nitrate-dependent regulation of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99:7253-65.

Weidner, S., Becker, A., Bonilla, I., Jaenicke, S., Lloret, J., Margaret, I., Pühler, A., Ruiz-Sainz, J.E., Schneiker-Bekel, S., Szczepanowski, R., Vinardell, J.M., Zehner, S., Göttfert, M. 2012. Genome sequence of the soybean symbiont *Sinorhizobium fredii* HH103. *J. Bacteriol.* 194:1617-1618.

Wek, R.C., Hatfield, G. W. 1988. Transcriptional activation at adjacent operators in the divergent-overlapping *ilvY* and *ilvC* promoters of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 203:643–663.

Wielbo, J., Mazur, A., Krol, J., Marczak, M., Kutkowska, J., Skorupska, A. 2004. Complexity of phenotypes and symbiotic behavior of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* exopolysaccharide mutants. *Arch Microbiol.* 182:331-336.

Willems, A. 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil.* 287:3-14.

Williams, M.N., Hollingsworth, R.I., Klein, S., Signer, E.R. 1990. The symbiotic defect of *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide mutants is suppressed by *lpsZ+*, a gene involved in lipopolysaccharide biosynthesis. *J. Bacteriol.* 172:2622–2632.

Wood, W.B. 1966. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. *J.Mol.Biol.* 16:118-133.

Wooldridge, K. 2009. Bacterial Secreted Proteins: Secretory Mechanisms and Role in Pathogenesis. Poole: Caister Academic Press.

Xu, L.M., Ge, C., Cui, Z., Li, J., Fan H. 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans, Int. J. Syst. Bacteriol. 45, 706–711.

Yang, F., Cheng, L., Zhang, L., Dai, W.J., Liu, Z., Yao, N., Xie, Z.P., Staehelin, C. 2009. Y4IO of *Rhizobium* sp. strain NGR234 is a symbiotic determinant required for symbiosome differentiation. J. Bacteriol. 191:735–746.

York, G.M., Walker, G.C. The succinyl and acetyl modifications of succinoglycan influence susceptibility of succinoglycan to cleavage by the *Rhizobium meliloti* glycanases ExoK and ExsH. J. Bacteriol. 180:4184–4191.

Young, J.P., Crossman, L.C., Johnston, A.W., Thomson, N.R., Ghazoui, Z.F., Hull, K.H., Wexler, M., Curson, A.R., Todd, J.D., Poole, P.S., Mauchline, T.H., East, A.K., Quail, M.A., Churcher, C., Arrowsmith, C., Cherevach, I., Chillingworth, T., Clarke, K., Cronin, A., Davis, P., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Norbertczak, H., Rabinowitsch, E., Sanders, M., Simmonds, M., Whitehead, S., Parkhill, J. 2006. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. Genome Biol. 7:R34.

Zehner, S., Schober, G., Wenzel, M., Lang, K., Göttfert, M. 2008. Expression of the *Bradyrhizobium japonicum* type III secretion system in legume nodules and analysis of the associated *tts box* promoter. Mol. Plant Microbe Interact. 21: 1087–1093.

Zevenhuizen, L.P.T.M. 1997. Succinoglycan and galactoglucan. Carbohydr. Polym. 33:139–144.

Zhan, H., Lee, C.C., Leigh, J.A. 1991. Induction of the second exopolysaccharide (EPSb) in *Rhizobium meliloti* SU47 by low phosphate concentrations. J. Bacteriol. 173:7391–7394.

Zhan, H., Leigh, J.A. 1990. Two genes that regulate exopolysaccharide production in *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 172:5254–5259.

Zhang, L., Chen, X.J., Lu, H.B., Xie, Z.P. and Staehelin, C. 2011. Functional analysis of the type 3 effector nodulation outer protein L (NopL) from *Rhizobium* sp. NGR234: symbiotic effects, phosphorylation, and interference with mitogen-activated protein kinase signaling. J. Biol. Chem. 286:32178–32187.

Anexo I. Material Suplementario y *Datasets*:

1. Material Suplementario Capítulo II.

- 1.1. Construcción y complementación de los mutantes *lpsL* y *rkpK* de *S. fredii* HH103
- 1.2. Ensayos de auto-agregación y biofilm
- 1.3. Referencias del material suplementario

<https://drive.google.com/open?id=0BwdSa-ux-fSMSGo5ajNzY1ByNGs>

2. Material Suplementario Capítulo IV.

- 2.1. Construcción y complementación del mutante $\Delta mucR1$
- 2.2. RNA-Seq
 - 2.2.1. Condiciones de cultivos, extracción de ARN y secuenciación
 - 2.2.2. Secuenciación de ARN
 - 2.2.3. Mapeo de los datos de RNA-Seq
 - 2.2.4. Cálculo de los genes diferencialmente expresados
- 2.3. Características generales y mapeo de las lecturas totales
 - 2.3.1. Número total de lecturas
 - 2.3.2. Control de calidad de las lecturas
 - 2.3.2.1. Contenido GC
 - 2.3.3. Distribución duplicada
 - 2.3.4. Distribución genética coordinada??
 - 2.3.5. Normalización
- 2.4. Referencias del material suplementario

<https://drive.google.com/open?id=0BwdSa-ux-fSMM0IfdmdXd2M1c0k>

3. Datasets

3.1. **Dataset 1.** Lista de los genes diferencialmente expresados en *S. fredii* HH103 $\Delta mucR1$

<https://drive.google.com/open?id=0BwdSa-ux-fSMUkNHdTgyajFPZ0E>

3.2. **Dataset 2.** Comparación de los datos de RNA-seq de *S. fredii* HH103 y su derivado $\Delta mucR1$ crecidos en ausencia de flavonoides.

<https://drive.google.com/open?id=0BwdSa-ux-fSMLTJjMUh5c19kS0E>

3.3. **Dataset 3.** Comparación de los datos de RNA-seq de *S. fredii* HH103 y su derivado $\Delta mucR1$ crecidos en presencia de genisteína

<https://drive.google.com/open?id=0BwdSa-ux-fSMSmt5UGpkei1Cb3M>

3.4. **Dataset 4.** Lista de los genes diferencialmente expresados encontrados en HH103 $\Delta mucR1$ respecto a *S. fredii* HH103 crecido en ausencia de flavonoides.

<https://drive.google.com/open?id=0BwdSa-ux-fSMUUhKLVVZOTThQa2c>

3.5. **Dataset 5.** Lista de los genes diferencialmente expresados encontrados en HH103 $\Delta mucR1$ respecto a *S. fredii* HH103 crecido en presencia de genisteína.

<https://drive.google.com/open?id=0BwdSa-ux-fSMRUZUbVZsWIA4Z2s>

3.6. **Dataset 6.** Lista de los genes diferencialmente expresados encontrados en HH103 $\Delta mucR1$ ($foldchange \geq 3$) tanto en ausencia como en presencia de de genisteína.


<https://drive.google.com/open?id=0BwdSa-ux-fSMRmx0cDQtZUF0MHM>

Anexo II. Publicaciones de esta tesis

Capítulo I:

Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., Crespo-Rivas, J.C., Medina, C., Murdoch, P. del S., Cuesta-Berrio, L., Rodríguez-Carvajal, M.A., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M. 2017. The *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103 *rkp-2* region is involved in the biosynthesis of lipopolysaccharide and exopolysaccharide but not in K-antigen polysaccharide production. Plant Soil. doi:10.1007/s11104-017-3268-z.

The *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103 *rkp-2* region is involved in the biosynthesis of lipopolysaccharide and exopolysaccharide but not in K-antigen polysaccharide production

Sebastián Acosta-Jurado · Pilar Navarro-Gómez · Juan-Carlos Crespo-Rivas · Carlos Medina · Piedad del Socorro Murdoch · Lidia Cuesta-Berrio · Miguel-Ángel Rodríguez-Carvajal · José-Enrique Ruiz-Sainz · José-María Vinardell 

Received: 3 November 2016 / Accepted: 25 April 2017
© Springer International Publishing Switzerland 2017

Abstract

Background Rhizobial surface polysaccharides are important molecular determinants required for successful symbiosis with legumes. In *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* Rm41, the *rkp-2* region is involved in the biosynthesis of K-antigen polysaccharide (KPS) and lipopolysaccharide (LPS). This region is composed of two genes, *lpsL*

and *rkpK*, which are respectively responsible for the production of galacturonic and glucuronic acid.

Results In this work, we show that in *S. (Ensifer) fredii* HH103 these genes do not form a transcriptional unit and that the transcriptional rate of *rkpK* is much higher than that of *lpsL*. Inactivation of each of these genes resulted in alterations in LPS, but did not affect KPS production, which is in agreement with the lack of uronic acids in *S. fredii* HH103 KPS. Mutation of *rkpK* also impaired HH103 exopolysaccharide (EPS) production, most probably due to the presence of glucuronic acid in HH103 EPS, as well as increased bacterial autoaggregation and osmosensitivity and decreased biofilm formation on plastic surfaces. Inactivation of *rkpK* affected negatively symbiosis with cowpea but not with soybean. Mutation of *lpsL* led to a complete symbiotic impairment with cowpea, whereas soybean plants inoculated with this mutant only formed pseudonodules. In both plants, the *lpsL* mutant showed defects in root infection.

Conclusion These results confirm the symbiotic importance of HH103 LPS in symbiosis with legumes.

Responsible Editor: Euan James.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11104-017-3268-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Acosta-Jurado · P. Navarro-Gómez · J.-C. Crespo-Rivas · J.-E. Ruiz-Sainz · J.-M. Vinardell (✉)
Departamento de Microbiología, Facultad de Biología,
Universidad de Sevilla, Avda. Reina Mercedes 6, 41012 Sevilla,
Spain
e-mail: jvinar@us.es
C. Medina
Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de
Olavide, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Junta de
Andalucía, Carretera de Utrera Km 1, 41013 Sevilla, Spain

P. Murdoch
Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular,
Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avda. Reina
Mercedes 6, 41012 Sevilla, Spain

L. Cuesta-Berrio · M.-Á. Rodríguez-Carvajal
Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química,
Universidad de Sevilla, C/ Profesor García González 1,
41012 Sevilla, Spain

Keywords Cowpea · Exopolysaccharide · K-antigen polysaccharide · Lipopolysaccharide · *Sinorhizobium fredii* · Soybean

Abbreviations

ARA Acetylene reduction assay
CF Calcofluor

CG	Cyclic glucans
EPS	Exopolysaccharide
GalA	Galacturonic acid
GlcA	Glucuronic acid
KPS	K-antigen polysaccharide
LPS	Lipopolysaccharide

Introduction

The rhizobia–legume nitrogen fixing symbiosis involves a complex molecular dialogue between both partners. On the bacterial side, different molecules have been identified as playing important roles in this dialogue (Jones et al. 2007; Downie 2010; López-Baena et al. 2016). Upon induction with root-exuded flavonoids, rhizobia produce a family of Nod factors, which are oligosaccharides of *N*-acetyl-glucosamine decorated with different substituents. Bacterial Nod factors are crucial for the establishment of symbiosis since their appropriate recognition by root-hair protein kinases not only is required for infection initiation but also elicits the development of nodules, specialized plant organs which host bacteroids (the bacterial form able to fix nitrogen) inside polyploid plant cells (Kondorosi et al. 2013).

In addition to Nod factors, other rhizobial molecules are required for a successful symbiosis. In the presence of appropriate flavonoids, some rhizobial strains, such as those belonging to *Bradyrhizobium japonicum* or *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* (Zehner et al. 2008; López-Baena et al. 2009), also secrete a cocktail of proteins through a type 3 secretion system. It has been proposed that these proteins could contribute to, at least in some host plants, overcome plant defence responses (Jiménez-Guerrero et al. 2015). Rhizobial surface polysaccharides, such as acidic exopolysaccharides (EPS), cyclic glucans (CG), lipopolysaccharides (LPS) and capsular K-antigen polysaccharides (KPS), can also play also important roles along the symbiotic interaction, most probably acting as molecular signals necessary for symbiosis progression (Downie 2010; Margaret et al. 2011; Janczarek et al. 2015; López-Baena et al. 2016). As an example, very recently it has been shown that in the *Mesorhizobium loti*–*Lotus japonicus* symbiosis, EPS oligosaccharide perception by a newly identified plant receptor kinase is required for a successful infection (Kawaharada et al. 2015, 2017).

K-antigen capsular polysaccharides have been proved to participate in the symbiosis of *Sinorhizobium fredii* and

S. meliloti with their host plants (Putnoky et al. 1990; Parada et al. 2006). The *S. meliloti* Rm41 KPS is composed of glucuronic acid (GlcA) and a derivative of the pseudaminic acid (PseAc). At present, three gene clusters required for KPS production have been identified in this strain: *rkp-1*, *rkp-2*, and *rkp-3* (Kiss et al. 2001). The *rkp-1* region is involved in the synthesis of a specific lipid carrier for KPS biosynthesis, whereas the *rkp-3* region is responsible for the synthesis of PseAc. The *S. meliloti* Rm41 *rkp-2* region is composed of two genes, *lpsL* and *rkpK*, which codes for an UDP-glucuronate 4-epimerase and an UDP-glucose 6-dehydrogenase respectively. Thus, *lpsL* and *rkpK* are respectively responsible for the production of galacturonic (GalA) and glucuronic (GlcA) acids. In Rm41, *lpsL* and *rkpK* are required for wild-type LPS biosynthesis. The *rkpK* gene is also necessary for the production of KPS (Kereszt et al. 1998) since, in this strain, this polysaccharide contains GlcA.

In previous works, we have isolated and studied the *rkp-1* and *rkp-3* regions of *S. fredii* HH103 (Parada et al. 2006; Hidalgo et al. 2010; Margaret et al. 2012; Margaret-Oliver et al. 2012), whose KPS is a homopolymer of a derivative of PseAc. The recent sequencing of the *S. fredii* HH103 genome has revealed the presence of orthologues of the Rm41 *lpsL* and *rkpK* genes. In the present work, we show that these two genes do not constitute a transcriptional unit. We have obtained *S. fredii* HH103 mutants in both genes and show that, in contrast to that reported for *S. meliloti* Rm41, they are not affected in KPS production. Both HH103 *lpsL* and *rkpK* mutants presented alterations in their LPS. The HH103 *rkpK* mutant, in addition, was devoid of EPS, showed clear differences in biofilm formation and autoaggregation abilities when compared with the wild-type strain and was negatively affected in its interaction with cowpea but not with soybean. The *lpsL* mutant only induced pseudonodules with soybean and exhibited a Nod[−] phenotype with cowpea.

Material and methods

Molecular and microbiological techniques

The bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Table S1. *Sinorhizobium fredii* strains were grown at 28 °C on TY medium (Beringer 1974), yeast extract/mannitol (YM) medium (Vincent 1970), MGM medium (O'Toole and Kolter 1998) or minimal medium

(MM, Rodríguez-Navarro et al. 2014). *Escherichia coli* strains were cultured on Luria–Bertani (LB) medium (Sambrook et al. 1989) at 37 °C. When required, the media were supplemented with the appropriate antibiotics as described by Vinardell et al. (2004a). Flavonoids were dissolved in ethanol at a concentration of 1 mg mL⁻¹ and used at 1 µg mL⁻¹. Plasmids were transferred from *E. coli* to rhizobia by conjugation as described by Simon (1984).

Recombinant DNA techniques were performed according to the general protocols of Sambrook et al. (1989). For hybridization, DNA was blotted to Amersham Hybond™ N nylon membranes, and the DigDNA method of Roche was employed according to the manufacturer's instructions. PCR amplifications were performed as previously described (Vinardell et al. 2004b). All primer pairs used in this work are listed in Table S2. Details of construction and complementation of mutants are provided in Supplementary Methods.

Auto-aggregation and biofilm formation assays

Assays for the study of bacterial auto-aggregation and biofilm formation on plastic surfaces were carried out as described by Acosta-Jurado et al. (2016a). More details are provided in Supplementary Methods.

EPS production and calcofluor and Congo red binding

To evaluate EPS production, rhizobial strains were cultured on solid YM medium for 120 h at 28 °C and then incubated for 48 h at room temperature. We used YM medium because, due to its high content on mannitol, it enhances the production of EPS. Calcofluor binding was tested on TY plates containing calcofluor (Sigma, Fluorescent Brightener 28) 0.02% *m/v* using 20-µL drops of bacterial cultures on TY with OD₆₀₀ of 0.4–0.5, visualized with UV and photographed by using the imaging instrument Gel Doc 2000 (Bio-Rad, <http://www.bio-rad.com/>). Congo red binding was analysed as previously described (Thomas-Oates et al. 2003).

PAGE analysis of LPS and KPS

LPS extraction from bacteria cultured on solid TY medium, separation on SDS-PAGE gels, silver staining and immuno-staining procedures with the monoclonal antibody NB6-228.22 were performed as described previously (Buendía-Clavería et al. 2003). KPS were

extracted from bacteria cultured on solid TY medium and analysed by PAGE as described by Hidalgo et al. (2010). KPS gels were fixed using Alcian Blue (0.5% in 2% acetic acid) and silver-stained.

NMR analysis of EPS

Culture media were concentrated up to 20% of the initial volume on a rotary evaporator, and three volumes of cold ethanol were added. After 24 h at 4 °C, the resulting precipitates were separated by centrifugation, dissolved in water and purified by dialysis against distilled water. Finally, the solutions were concentrated and freeze-dried. Polysaccharides isolated from culture media were deuterium-exchanged several times by freeze-drying from D₂O and then examined in solution (2–5 mg/750 µL of 99.98% D₂O) by ¹H-NMR. Spectra were recorded at 353 K on a Bruker AV500 spectrometer operating at 500.20 MHz (¹H). Chemical shifts are given in parts per million, using the HDO signal (4.22 ppm) (¹H) as reference.

NMR analysis of KPS

For the detection of KPS by NMR, *S. fredii* strains were cultured as follows: 1 L of TY liquid medium was inoculated with 5 mL of early stationary-phase cultures of bacteria and incubated on an orbital shaker at 180 rpm for 4 days at 28 °C. After incubation, the cells were harvested by slow-speed centrifugation. Bacterial pellets were washed three times with 0.9% (w/v) NaCl, freeze-dried and stored in sealed bottles at room temperature. Bacterial polysaccharides were extracted from the freeze-dried bacterial cells (5 g) with 1:1 hot phenol/water mixture (100 mL), and the two phases were separated (Westphal and Jann 1965). The aqueous phase was dialyzed against water and freeze-dried.

Cell extract samples were deuterium-exchanged several times by freeze-drying from D₂O and then examined in solution (5 mg/750 µL of 99.98% D₂O) by ¹H-NMR. Spectra were recorded at 303 K on a Bruker AV500 spectrometer operating at 500.20 MHz. Chemical shifts are given in parts per million, using the HDO signal (4.71 ppm) as reference.

Nodulation and competition for nodulation assays

Nodulation assays on *Glycine max* (L.) Merr. cv. Williams and *Vigna unguiculata* (L.) cv. Bisbee Red

Table 1 Plant responses to inoculation of *Glycine max* cv. Williams and *Vigna unguiculata* with *S. fredii* strains HH103 Rif^R and its *lpsL* (SVQ763) and *rkpK* (SVQ703) derivatives^a

Legume tested ^b	Inoculant ^c (mutated gene)	Plant-top dry weight (g) ^d	Number of nodules	Nodule dry weight (mg)
<i>G. max</i>	HH103 Rif ^R	1.62 ± 0.37	79.0 ± 17.8	832.4 ± 144.6
	SVQ763 (<i>lpsL</i>)	0.55 ± 0.12 ^f	0 ± 0 ^f	0 ± 0 ^f
	SVQ763C	1.42 ± 0.47	82.5 ± 23.2	814.3 ± 201.1
	SVQ703 (<i>rkpK</i>)	1.87 ± 0.68	56.6 ± 16.1	874.4 ± 346.3
	SVQ703 pMUS1193	1.38 ± 0.44	72.2 ± 25.1	748.0 ± 226.8
<i>V. unguiculata</i>	HH103 Rif ^R	0.99 ± 0.36	43.9 ± 12.9	604.2 ± 163.8
	SVQ763 (<i>lpsL</i>)	0.14 ± 0.04 ^f	0 ± 0 ^f	0 ± 0 ^f
	SVQ763C	0.96 ± 0.39	44.2 ± 7.5	605.6 ± 215.3
	SVQ703 (<i>rkpK</i>)	0.42 ± 0.12 ^f	25.4 ± 7.3 ^f	201.7 ± 82.2 ^f
	SVQ703C ^e	1.37 ± 0.36	56.8 ± 11.9	756 ± 225
	SVQ703 pMUS1193	1.32 ± 0.68	56.3 ± 25.7	721.3 ± 352.3

^a Data represent averages of four to five jars containing two plants for soybean and of 8–10 plants for cowpea. Nodules and plant-tops were collected at 39 dpi for soybean and 35 dpi for cowpea

^b For each legume, each mutant was compared pairwise with the parental strain HH103-Rif^R by using the Mann–Whitney non-parametric test

^c Plan-top dry weight of non-inoculated plants was 0.42 ± 0.08 g for soybean (per jar) and 0.13 ± 0.05 g for cowpea (per plant)

^d Bacteria isolated from 12 nodules formed by each inoculant showed the expected resistance markers

^e Data showed for this strain were obtained in an independent nodulation assay in which SVQ703C was also undistinguishable of HH103 and significantly different from SVQ703 in the three parameters analysed

^f Numbers on the same column are significantly different from those of HH103-Rif^R at the level $\alpha = 5\%$

were carried out as previously described by Crespo-Rivas et al. (2007) and Hidalgo et al. (2010). At least two independent nodulation assays (giving similar results) were performed for each rhizobial strain. Table 1 shows representative experiments. Germinated seeds were transferred to Leonard jars containing sterilized vermiculite supplemented with Fåhræus nutrient solution (Vincent 1970). Each plant was inoculated with approximately 10^8 bacteria and then grown for at least 6 weeks with a 16-h photoperiod at 25 °C in the light and 18 °C in the dark. Plant tops were dried at 70 °C for 48 h and weighed. Bacterial isolation from surface-sterilized nodules was carried out as previously described by Buendía-Clavería et al. (2003). Nitrogenase activity of nodules was estimated by acetylene reduction assay (ARA) as previously reported (Acosta-Jurado et al. 2016b).

Nodule primordia visualization

Cowpea and soybean seedlings were grown under hydroponic conditions (30 mL of Fåhræus nutrient solution) for 2 days and then inoculated with early

exponential rhizobial cultures (1 mL, OD₆₀₀ of 0.4–0.5). Approximately 10 days after inoculation, plants were carefully taken from the hydroponic solution; roots were excised and bleached with commercial bleach for 20 min and washed several times with water to eliminate the bleach. Then, roots were stained with methylene blue 0.1% (m/v) for 5 min and rinsed with water several times to reduce the background. Stained roots were photographed under a stereo microscope Optika SZN-4. At least five plantlets inoculated with each strain were analysed.

Fluorescence microscopy

For the visualization of inoculated roots, soybean and cowpea young plantlets (5 days after germination) were cultivated under hydroponic conditions in 25-mm-diameter, 245-mm-long glass tubes (a plant per tube) containing a cylinder of filter paper closely touching the inner side of the tube and filled with 100 mL of Fåhræus plant nutrient solution. After sterilization, each tube was capped with sterile cotton and covered with parafilm in order to prevent excessive evaporation. Each plantlet

was placed on top of the tube in such a way that the root remained between the filter paper and the glass, allowing easy scoring of the appearance of nodules. Each plantlet was inoculated with 1 mL of early exponential rhizobial culture (OD₆₀₀ of 0.4–0.5). Fourteen days after inoculation, fragments of about 2–3 cm were cut and placed in slides containing some drops of phosphate-buffered saline (PBS) and mounted with coverslips when necessary. An inverted epifluorescence microscope Leica DMI4000 B (320×) was used to directly visualize root hairs and red fluorescent bacteria. For a deeper visualization of bacteria inside plants, a confocal microscope Leica SPE (200–400×) was used. The auto-fluorescence of the plant (blue channel) was monitored with a 405-nm laser beam. At least five plantlets inoculated with each strain were analysed.

Gene expression analysis

For RT-PCR analysis, *S. fredii* strains were grown at 28 °C until stationary phase (OD₆₀₀ ≈ 1.2) on yeast extract mannitol medium (YM). When required, the media were supplemented with the appropriate antibiotics. Total RNA was isolated using a High Pure RNA Isolation Kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. To ensure that genomic DNA was not present in RNA samples, a control PCR was done employing primers *qlpsL*-F and *qlpsL*-R (Table S2). Only those RNA samples showing no PCR amplification were selected for further work. Reverse transcription of total RNA was carried out using the QuantiTect kit (Qiagen), which includes a genomic DNA elimination step before RNA reverse transcription. RT-PCR products were visualized by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining.

*q*PCR experiments were performed in a 20-μL final volume containing 1 μL of complementary DNA (cDNA), 0.6 pmol of each primer and 10 μL of FastStart SYBR Green Master Mix (Roche Diagnostics). Quantitative PCR was driven in a LightCycler 480 (Roche) with the following conditions: 95 °C, 10 min; 95 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 20 s; 40 cycles, followed by the melting curve profile from 60 to 95 °C to verify the specificity of the reaction. Primer pairs used for amplification of the internal fragment of the *S. fredii* HH103 *lpsL* (140-bp) and *rkpK* (152-bp) cDNAs were *qlpsL*-F/*qlpsL*-R and *qrkpK*-F/*qrkpK*-R respectively (Table S2). To normalize the data, a 197-bp internal fragment of the *S. fredii* HH103 16S rRNA

(accession number AY260145) was employed as an internal control in each sample by using primers HH16S-F and HH16S-R (Table S2). The relative expression of the *rkpK* and *lpsL* genes in HH103 was calculated by using the formula $2^{-\Delta\Delta C_T}$, where $\Delta\Delta C_T = (C_{T \text{ rkpK}} - C_{T \text{ 16S}}) \text{ HH103} - (C_{T \text{ lpsL}} - C_{T \text{ 16S}}) \text{ HH103}$. Three independent experiments performed in triplicate were carried out and averaged.

Results

Genetic organization and transcriptional analyses of the *rkp-2* region of *S. fredii* HH103

The *S. fredii* HH103 *rkp-2* region is located on the chromosome (accession number HE616890) and is composed of two genes, *lpsL* and *rkpK* (Vinardell et al. 2015), which were identified because of their identity to the *S. meliloti* *rkp-2* region (Kereszt et al. 1998). The *lpsL* (SFHH103_00769, 1026-bp) and *rkpK* (SFHH103_00768, 1314-bp) genes code for an UDP-glucuronate 4-epimerase (341-aa residues) and an UDP-glucose 6-dehydrogenase (437-aa residues) which are 90 and 88% identical to the *S. meliloti* 1021 *LpsL* and *RkpK* proteins respectively. Thus, based on their homology, *lpsL* and *rkpK* are putatively responsible for the synthesis of galacturonic and glucuronic acids in *S. fredii* HH103. Blastp searches using either the HH103 *RkpK* or the *LpsL* sequence as a query revealed that no other proteins showing at least 40% of identity to these enzymes were present on the HH103 genome.

The intergenic region between the HH103 *lpsL* and *rkpK* genes comprises 133 nucleotides. In order to test whether these genes could be co-transcribed, we used RT-PCR for searching putative HH103 messenger RNAs (mRNAs) covering the 3'-end of *lpsL* and the 5'-end of *rkpK* by using primers LK-F and LK-R (Fig. 1, Table S2). As positive controls, we used primer pairs *qlpsL*-F/*qlpsL*-R and *qrkpK*-F/*qrkpK*-R, which allow the amplification of internal fragments of the *lpsL* and *rkpK* genes respectively. As a negative control, we used primer pair *lpsBE*-F/*lpsBE*-R, which does not lead to amplification when cDNA is used as template since the *lpsB* and *lpsE* genes are transcribed in opposite directions (Margaret et al. 2013). When the HH103 genomic DNA (gDNA) was used as a template, all these primer pairs led to the amplification of DNA fragments showing the expected size. However, only the internal

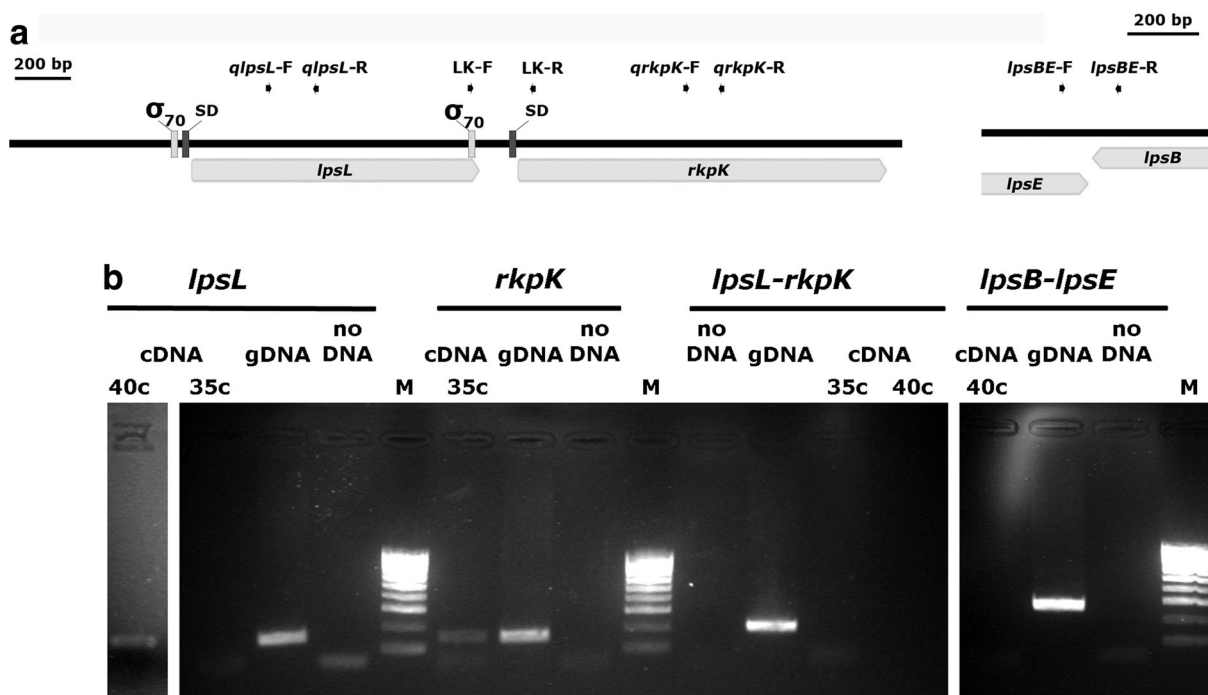


Fig. 1 *S. fredii* HH103 *lpsL* and *rkpK* are not co-transcribed. **a** Genetic organization of the HH103 *rkp-2* region. The putative promoter and ribosome-binding sequences (denoted as σ_{70} and SD respectively), as well as the priming sites for different oligonucleotides used in PCR experiments, are indicated. The *lpsB-lpsE* genetic region, used for the negative control of co-transcription (**b**), is shown on the left. **b** Agarose gel electrophoresis of samples resulting from PCR and RT-PCR experiments. The template used

(HH103 gDNA, HH103 cDNA or no DNA) as well as the number of cycles used for RT-PCR experiments are shown. For negative controls (no DNA), 40 cycles were used. Primers used led to the amplification of internal fragments of the *lpsL* or *rkpK* genes, or fragments connecting the 3'-end of *lpsL* and the 5'-end of *rkpK* (*lpsL-rkpK*) or the 3'-ends of *lpsB* and *lpsE* (*lpsB-lpsE*). M, 100 bp-ladder DNA marker

fragments of *rkpK* and *lpsL* could be PCR-amplified by using the HH103 cDNA as a template, indicating that *lpsL* and *rkpK* are not co-transcribed. These results prompted us to investigate whether each of these genes could have its own promoter. By using the BPROM program (Solovyev and Salamov 2011; <http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>), we found bacterial sigma70 promoter sequences upstream of both genes, at positions -25 and -150 for *lpsL* and for *rkpK* respectively. Moreover, the GenDB system (Meyer et al. 2003), which has been used for the automatic gene prediction and annotation of the *S. fredii* HH103 genome (Weidner et al. 2012; Vinardell et al. 2015), predicts the presence of Shine–Dalgarno sequences for both *lpsL* (GGGA, 8 bp before the start codon) and *rkpK* (AGGA, 7 bp before the start codon).

Results shown in Fig. 1 also suggested that, at least in the experimental condition tested, the *lpsL* and *rkpK* genes had different transcription rates since amplification of the

internal fragments of *lpsL* and *rkpK* using cDNA as the template was evident after 40 and 35 cycles respectively. In order to test this possibility, we further investigated the expression of these genes by two different methods.

First, we analysed the expression of HH103 *lpsL* and *rkpK* by using a qPCR approach. For this purpose, HH103 cDNA was used as a template and the level of *lpsL* and *rkpK* mRNA internal fragments was measured by using primer pairs *qlpsL-F/qlpsL-R* and *qrkpK-F/qrkpK-R* respectively. Following this methodology, the *rkpK* transcript level was found to be much higher (77.3 ± 15.6 -fold) than that of *lpsL*.

Second, we have recently carried out a global transcriptomic analysis of *S. fredii* HH103 grown in the absence or presence of flavonoids (Pérez-Montañó et al. 2016; available at Sequence Read Archive of NCBI, BioProject database, under the BioProject ID PRJNA313151). These analyses show that the number of transcripts of *rkpK* is approximately 20–25-fold that of *lpsL* both in the absence (5668 vs 222) and in the

presence of genistein (4820 vs 241). These analyses also showed that the transcription of these two genes is not significantly affected by the presence of genistein.

Thus, our results indicate not only that *lpsL* and *rkpK* are independently transcribed, as it has been previously described for the *S. meliloti* Rm41 *rkp-2* region, but also that the expression level of *rkpK* is much higher than that of *lpsL*.

As described in the “Material and methods” section, an *lpsL* (called SVQ763) mutant and a *rkpK* (SVQ703) *S. fredii* HH103 mutant were constructed by introduction of the *lacZ*Δp-Gm^R cassette (Becker et al. 1995). In both cases, the transcriptional orientation of the *lacZ*Δp gene was opposite to that of the mutated gene. Following a PCR-based screening of a HH103 genomic library, a cosmid (pMUS1193) containing the whole *rkp-2* region was isolated. This cosmid was introduced by conjugation into the HH103 *rkpK* derivative. By unknown reasons, we were not able to transfer this cosmid to the *lpsL* mutant of HH103. A complemented version (called SVQ763C or *lpsL* C and SVQ703C or *rkpK* C) of the HH103 *lpsL* and *rkpK* mutants was obtained by integration of the wild-type versions of the *lpsL* and *rkpK* genes respectively.

S. fredii HH103 *lpsL* or *rkpK* mutants are affected in LPS but not in KPS production

In *S. meliloti* Rm41, inactivation of any of the genes which constitute the *rkp-2* region provokes alterations of the LPS that are detectable in electrophoretic analyses (Kereszt et al. 1998). The LPS profiles of the HH103 *rkp-2* mutants were analysed by PAGE experiments performed in the presence of SDS (Fig. 2a) as well as by immunostaining experiments using the NB6-228.22 monoclonal antibody (Fig. 2b), which recognizes the LPS of HH103 (Buendía-Clavería et al. 2003). The electrophoretic profile of the LPS of mutants SVQ763 (*lpsL*) and SVQ703 (*rkpK*) (Fig. 2a, lanes 2 and 5 respectively) was altered in comparison with that of the parental strain (lanes 1, 4, 7 and 8). Both mutants showed similar alterations, which consisted in an increase of the electrophoretic mobility of both the smooth (slow-migrating bands, corresponding to the whole LPS showing different degrees of polymerization of the O-antigen) and the rough LPS (fast-migrating bands, corresponding to LPS molecules constituted by lipid A and core). The monoclonal antibody NB6-228.22 recognized the *S. fredii* HH103 Rif^R LPS (Fig. 2b, lanes 1,

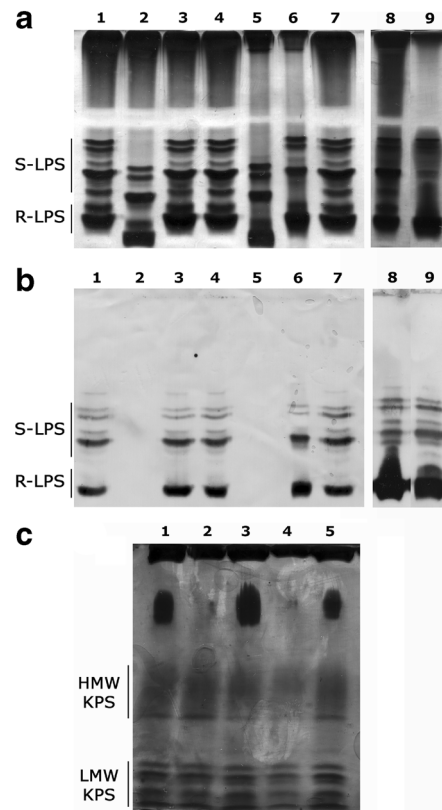


Fig. 2 *S. fredii* HH103 *rkp-2* mutants are affected in lipopolysaccharide (LPS) but not in capsular polysaccharide (KPS) production. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of LPS and KPS of crude extracts from *Sinorhizobium fredii* HH103 Rif^R and different derivatives. PAGE of LPS samples was run in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS) and silver-stained (a) or immuno-stained using the monoclonal antibody NB6-228.22 (b). PAGE of KPS samples was run in the absence of detergent, treated with Alcian Blue, and silver-stained (c). The high- (HMW) and low-molecular-weight (LMW) forms of KPS and the rough (R-LPS) and smooth (L-LPS) forms of LPS are indicated. **a, b** Lanes 1, 4, 7 and 8, HH103 Rif^R; lane 2, SVQ763; lane 3, SVQ763C; lane 5, SVQ703; lane 6, SVQ703 pMUS1193; lane 9, SVQ703C. **c** Lane 1, HH103 Rif^R; lane 2, SVQ763; lane 3, SVQ763C; lane 4, SVQ703; lane 5, SVQ703 pMUS1193

4, 7 and 8), but failed in the recognition of the altered LPS produced by mutants SVQ763 and SVQ703 (Fig. 2b, lanes 2 and 5). The complemented versions of SVQ763 and SVQ703 (both *in cis* and *in trans*) showed electrophoretic and NB6-228.22-immunostaining patterns that were undistinguishable from those of the wild-type strain (lanes 3, 6 and 9 of Fig. 2a, b respectively).

HH103 *lpsL* and *rkpK* mutants were also investigated for the production of KPS by PAGE experiments followed by a treatment with Alcian Blue and silver

staining (Fig. 2c). PAGE experiments to visualize KPS were carried out in the absence of SDS to avoid interferences of LPS. For mutants SVQ763 (*lpsL*) and SVQ703 (*rkpK*), the silver-stained material that presumably corresponds to the high-molecular weight (HMW) forms of KPS was undistinguishable from that of the wild type, suggesting that inactivation of *rkp-2* genes does not affect KPS production in HH103. This result was confirmed by $^1\text{H-NMR}$ analyses (Fig. S1). As expected, internal cyclic glucan (CG) production was neither affected in any of the *rkp-2* mutants analysed in this study (Fig. S1).

The *S. fredii* HH103 *rkpK* gene is also involved in EPS production

Very recently, we have published the structure of the EPS of *S. fredii* HH103 (Rodríguez-Navarro et al. 2014) and demonstrated that it contains glucuronic acid. This fact prompted us to investigate the possible relation of the HH103 *rkpK* gene to EPS synthesis.

As shown in Fig. 3, inactivation of *rkpK* (mutant SVQ703) led to a rough appearance when bacteria were cultured on YMA plates. Complementation of the mutation, either *in cis* or *in trans*, restored mucoidy to wild-type levels. Inactivation of *lpsL* did not influence bacterial mucoidy.

EPS production was further investigated by quantification of extracellular free sugars. The amount of glucose equivalents in culture supernatants of SVQ703 ($2.7 \pm 1.1 \text{ mg mL}^{-1}$) was significantly lower ($\alpha = 5\%$, non-parametric test of Mann–Whitney) than that of HH103 (39.1 ± 1.6) and restored up to the wild-type

level by the presence of cosmid pMUS1193 (29.9 ± 1.2) or by the introduction of a wild-type copy of the *rkpK* gene (27.5 ± 3.2). In the case of mutant SVQ763, the amount of glucose equivalents (42.5 ± 4.9) was similar to that found in HH103 cultures. This study was further completed by NMR analysis of the EPS isolated from culture media by precipitation with ethanol. Figure 4 shows the $^1\text{H-NMR}$ spectra of polysaccharides produced by *S. fredii* HH103 Rif^R and their *lpsL* (SVQ763) and *rkpK* (SVQ703) mutant derivatives, as well as that of the complemented versions of the *rkpK* mutant (SVQ703C and SVQ703 pMUS1193). Spectra from SVQ763, SVQ703C and SVQ703 pMUS1193 showed signals from an EPS very similar to that found in SVQ269 (small differences in SVQ703C are produced by a partial de-*O*-acetylation when heating at 353 K during acquisition) (Rodríguez-Navarro et al. 2014). These signals cannot be found in the case of SVQ703, as its $^1\text{H-NMR}$ spectrum showed only signals from KPS (Gil-Serrano et al. 1999) and a mannan from yeast extract, which indicates that this mutant is unable to produce EPS.

Some rhizobia, such as *S. meliloti* 1021, produce an EPS able to bind calcofluor (CF) so they exhibit a blue-green fluorescence when grown in medium supplemented with CF and irradiated with long-wave UV light (CF⁺ phenotype) (Leigh et al. 1985). The ability of *S. fredii* HH103 *lpsL* and *rkpK* mutants to bind CF was examined by culturing them on TY plates supplemented with this dye (Fig. 3). In these experiments, two other *S. fredii* HH103 derivatives were included: an *exoA* mutant, unable to produce EPS (Parada et al. 2006), and a *lpsB* mutant, which produces an altered LPS (Margaret et al.

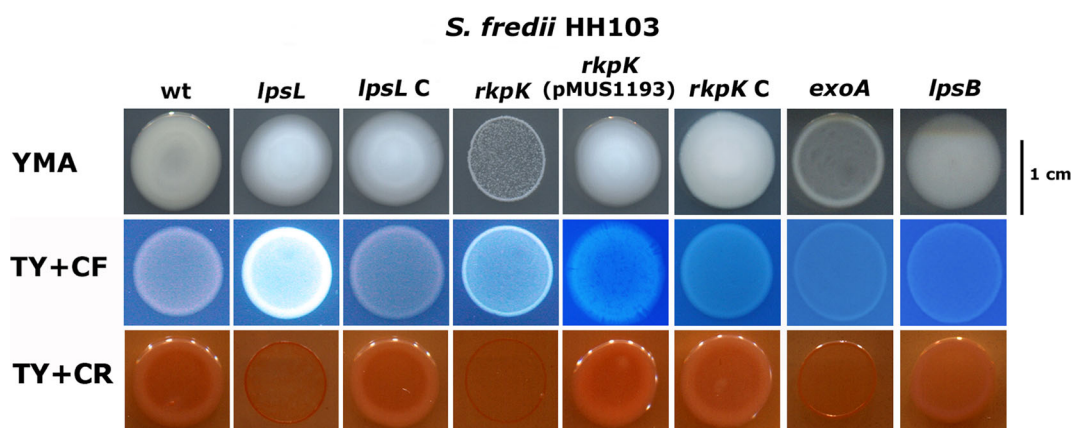
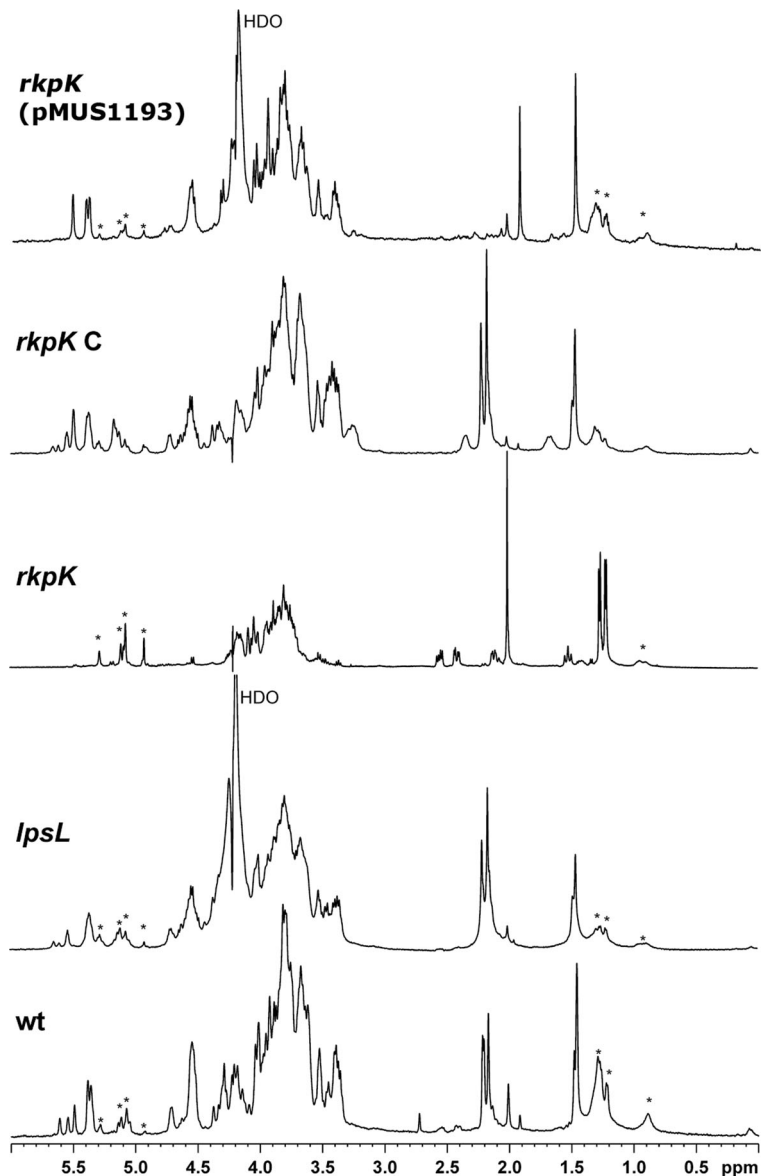


Fig. 3 Mucoidy (on YMA medium) and calcofluor and Congo red binding capacity (on TY medium) of *S. fredii* HH103 Rif^R and different derivatives

Fig. 4 ^1H -NMR spectra (500 MHz, 353 K) of polysaccharides isolated from culture media of *S. fredii* HH103 Rif^R (marked as *wt*), its *lpsL* (SVQ763) and *rkpK* (SVQ703) mutants and the complemented versions of the *rkpK* mutant SVQ703C (marked as *rkpK C*) and SVQ703 pMUS1193 (marked as *rkpK pMUS1193*). HDO, signals from monodeuterated water. Asterisks indicate signals from culture media

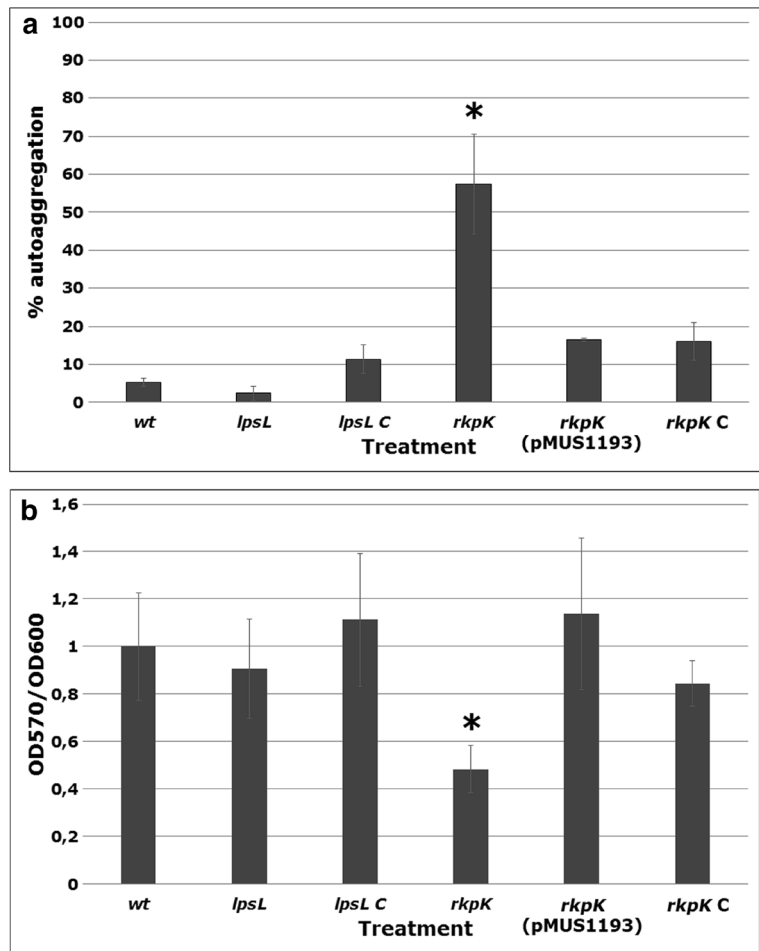


2013). In contrast to the wild type and its *exoA* and *lpsB* derivatives, both *rkp-2* mutants were CF⁺, whereas the complemented versions of both mutants showed a similar behaviour as the wild-type strain. The ability to bind CF of the *lpsL* derivative was remarkably higher than that of the *rkpK* mutant.

The Congo red dye has frequently been used when investigating polysaccharide mutant strains due to its capacity to bind many types of bacterial polysaccharides (Thomas-Oates et al. 2003). Some rhizobial mutants affected in surface polysaccharides are altered in their ability to bind Congo red, resulting in a different

colouring when compared with their parental strain. Because of this, we examined the colony phenotype of the *rkp-2* mutants of *S. fredii* HH103 as well as that of the *exoA* and *lpsB* derivatives when cultured on TY plates supplemented with this dye. Interestingly, as shown in Fig. 4, the growth of the HH103 *lpsL* and *rkpK* mutants, as well as that of HH103 *exoA*, was severely diminished in the presence of Congo red. The complemented versions of both mutants were able to grow in that condition, and showed a similar aspect as that of the wild-type strain. None of the tested strains exhibited a significant accumulation of this dye.

Fig. 5 Autoaggregation (a) and biofilm formation (b) capacities of *S. fredii* HH103 Rif^R and different derivatives. Treatments that were significantly different to the wild-type strain (non-parametric test of Mann–Whitney, $\alpha = 5\%$) are marked with an asterisk



In a previous study, we studied the osmotolerance of *S. fredii* HH103 in culture media supplemented with either NaCl or sucrose and showed that an *exoA* mutant of *S. fredii* HH103 was severely impaired for growing in minimal medium (MM) under hyperosmotic stress (Rodríguez-Navarro et al. 2014). In this work, we have analysed whether the cell surface changes promoted by inactivation of *lpsL* and *rkpK* have an effect on osmosensitivity (Fig. S2). In these experiments, *S. fredii* HH103 *exoA* (EPS[−]) and *lpsB* (altered LPS) mutants were also included. *S. fredii* HH103 *rkpK* exhibited low viability in MM, and it was partially and fully impaired for growth at sucrose 5% (*m/v*) and at 25 mM NaCl respectively. The *lpsL* mutant showed a similar behaviour as the *lpsB* derivative, and both these mutants were slightly more osmosensitive to sucrose than the wild-type strain. Both *lpsB* and *lpsL* mutants, especially the latter, were also more sensitive to NaCl hyperosmotic stress than *S. fredii* HH103.

Complementation of *lpsL* and *rkpK* mutations restored the wild-type behaviour on MM.

Biofilm formation and auto-aggregation capacities are altered in the *S. fredii* HH103 *rkpK* derivative SVQ703

Rhizobial surface polysaccharides play an important role in biofilm formation and auto-aggregation abilities (Downie 2010; Sorroche et al. 2012). Because of this, we studied whether inactivation of *rkpK* (strain SVQ703) or that of *lpsL* (strain SVQ763) affected those bacterial traits.

Planktonic auto-aggregative behaviour was investigated following the methodology described in the “Material and methods” section. As shown in Fig. 5a, inactivation of *rkpK*, but not that of *lpsL*, led to increased autoaggregation when compared to the wild-type HH103 strain. Regarding biofilm formation onto plastic surfaces, strain SVQ703 (*rkpK* mutant) showed a

significant reduction in this ability in comparison to HH103 or its *lpsL* derivative SVQ763 (Fig. 5b). Complementation, either *in cis* or *in trans*, of the *rkpK* mutation restored wild-type levels of both auto-aggregation and biofilm formation (Fig. 5a, b).

Inactivation of *rkp-2* genes impaired the symbiotic relationship of *S. fredii* HH103 with soybean and cowpea

The symbiotic phenotype of *S. fredii* HH103 *lpsL* and *rkpK* mutants was investigated with two host plants, *G. max* cv. Williams (soybean) and *V. unguiculata* cv. Bisbee Red (cowpea). Three different parameters were analysed: plant-top dry weight, nodule number and fresh weight of nodules (Table 1).

The HH103 *rkpK* mutant (SVQ703) showed different symbiotic behaviours depending on the host plant. Thus, it was not affected in its interaction with soybean, but impaired in its nodulation ability with cowpea although it was able to induce the formation of nitrogen-fixing nodules by this plant (Table 1; Fig. S3). The presence of cosmid pMUS1193 or the introduction *in cis* of a wild-type copy of *rkpK* (strain SVQ703C) enhanced the symbiotic capacity of SVQ703 up to that of the parental strain. Another relevant characteristic of SVQ703 is that cowpea plants inoculated with this strain showed a more disperse pattern of nodulation than plants inoculated with the parental strain (Fig. S3).

Competitiveness of the HH103 *rkpK* derivative to nodulate soybean was also investigated. SVQ703 was negatively affected when it was co-inoculated with its parental strain HH103 Rif^R in a 1:1 ratio. In two different assays, only 23.3 and 0.9% of the nodules were occupied respectively by SVQ703. The presence of cosmid pMUS1193 in strain SVQ703 restored the competition ability to nodulate soybean (48.5% of nodules).

The HH103 *lpsL* mutant (SVQ763) was severely impaired in its symbiotic capacity since no nitrogen-fixing nodules were found in roots of the two host plant tested (Fig. S4). Due to this fact, soybean and cowpea plants inoculated with strain SVQ763 showed clear symptoms of nitrogen starvation and their weights were similar to those of non-inoculated plants (Table 1; Fig. S4, panels A and B). In the case of soybean, but not in that of cowpea, plants inoculated with SVQ763 formed numerous pseudonodules (Fig. S4, panels D and F). Acetylene reduction assay (ARA) confirmed that these structures did not fix nitrogen since no peak of

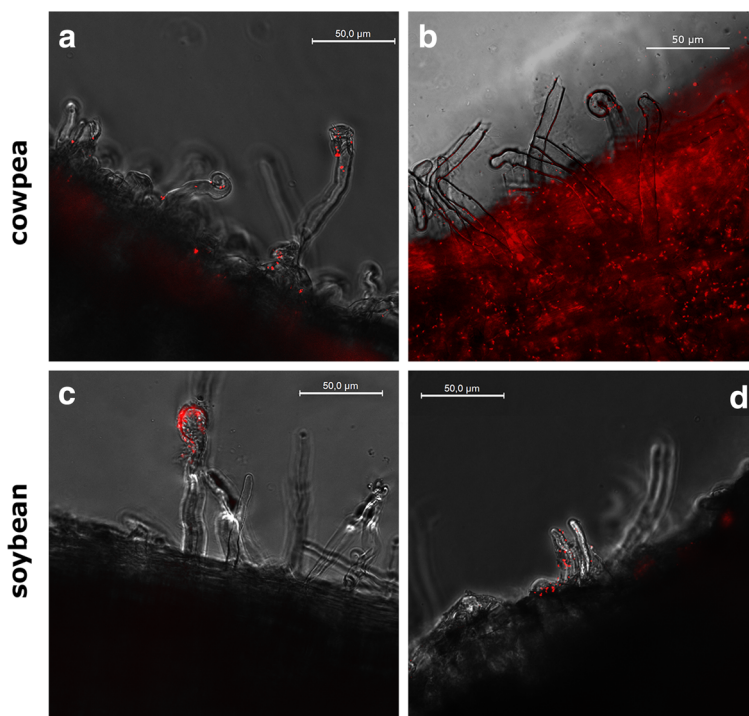
ethylene was detected. Complementation of the *lpsL* mutation by the introduction *in cis* of a wild-type copy of this gene (strain SVQ763C) restored the symbiotic parameters analysed to the levels exhibited by the wild-type strain, including nitrogen fixation as estimated by ARA (26.0 ± 5.5 vs 23.3 ± 5.8 nmol ethylene per plant and hour in the wild-type strain).

In order to better understand the symbiotic impairment of SVQ763 with the two host plants investigated, we carried out additional studies. First, we analysed the formation of nodule primordia in soybean and cowpea roots. As shown in Fig. S5, the presence of SVQ763 elicited the initiation of nodule development not only in soybean (where pseudonodules had been found in nodulation assays) but also in cowpea (where no macroscopic structures had been found after inoculation with SVQ763). In addition, HH103 and SVQ763 derivatives carrying plasmid pFAJDsRed (Acosta-Jurado et al. 2016c) and, because of this, expressing the red fluorescent protein DsRed, were used to investigate root hair deformation and bacterial infection of cowpea and soybean roots. By using epifluorescence microscopy, we found that HH103 was able to induce root deformation in cowpea and soybean (Fig. 6a, c respectively); root hair deformation was also found for the *lpsL* mutant in the case of cowpea (Fig. 6b) but not in the case of soybean (Fig. 6d). Bacterial infection was studied by confocal microscopy (Fig. 7). In the case of cowpea, well-defined infection threads were found neither in the case of the wild-type strain (Fig. 7a, b) nor in that of its *lpsL* derivative (Fig. 7c, d). Although both HH103 and its *lpsL* derivative were able to enter into cowpea roots, a striking difference between these two strains could be noted. Cells of *S. fredii* HH103 were distributed between root plant cells and did not aggregate. In contrast, most cells of strain SVQ763 tended to aggregate in spherical structures that appeared to be located between plant cells, which might suggest a plant defence response. Regarding soybean, infection threads were scored in the case of HH103 (Fig. 7e, f), but not in that of strain SVQ763, whose cells appeared to be located outside the root (Fig. 7g, h).

Discussion

In this work, we have analysed the role of the *S. fredii* HH103 *lpsL* and *rkpK* genes in surface polysaccharide production and in the symbiotic interactions of this

Fig. 6 Epifluorescence microscopy analysis of cowpea and soybean roots inoculated with *S. fredii* HH103 (**a, c**) and its *lpsL* derivative (**b, d**). Bars correspond to 50 μ m



strain with two host legumes, *G. max* (soybean) and *V. unguiculata* (cowpea).

These genes were first described in *S. meliloti* Rm41 (Kereszt et al. 1998), in which they constitute the so-

called *rkp-2* region. The *lpsL* and *rkpK* genes code for an UDP-glucuronate 4-epimerase and an UDP-glucose 6-dehydrogenase respectively. Thus, RkpK is responsible for the oxidation of UDP-glucose into UDP-

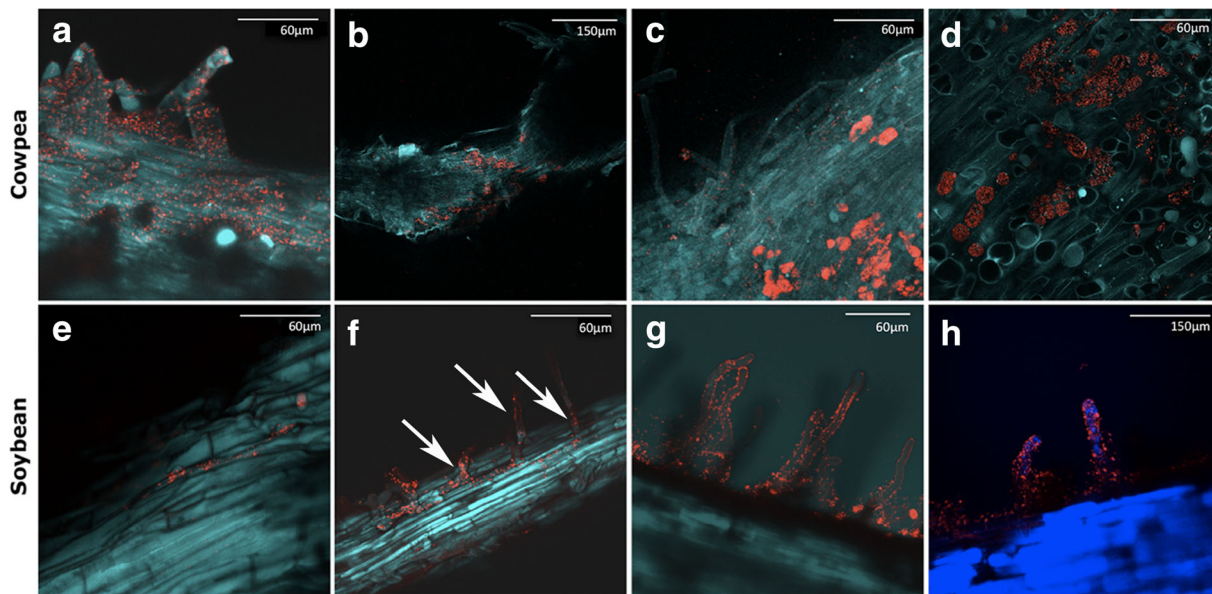


Fig. 7 Confocal microscopy analysis of cowpea and soybean roots inoculated with *S. fredii* HH103 (**a, b, e, f**) and its *lpsL* derivative (**c, d, g, h**). Bars correspond to 60 μ m for **a, c-g**, and

150 μ m for **b, h**. Infection threads in soybean roots inoculated with *S. fredii* HH103 are indicated with white arrows in **f**

glucuronic acid, whereas *LpsL* accounts for the conversion of UDP-glucuronic acid into UDP-galacturonic acid. The name of this genetic region is allusive to the involvement of the *rkpK* gene in KPS production in Rm41, since the capsular polysaccharide of this strain contains glucuronic acid (Reuhs et al. 1998). Capsular polysaccharides are strain-specific, and the *S. fredii* HH103 KPS is a homopolysaccharide in which the repeating unit is a derivative of the pseudoamino acid (Gil-Serrano et al. 1999). Thus, the fact that neither *lpsL* nor *rkpK* inactivation affected KPS production in HH103 is coherent with the absence of both glucuronic and galacturonic acids in this polysaccharide. In contrast, these uronic acids are present in HH103 LPS (our preliminary results), which accounts for the fact that both HH103 *rkp-2* mutants are affected in LPS production, as it was previously described for *S. meliloti* Rm41 (Kereszt et al. 1998). The fact that the alteration in the LPS electrophoretic pattern in both mutants (*lpsL* and *rkpK*) affected smooth and rough LPS clearly suggests that the structural part affected might be the lipid A and/or the core oligosaccharide. In fact, the presence of uronic acids is common in the LPS core of many rhizobia. In addition, in several rhizobia, including *Rhizobium etli* CE3 but not *S. fredii* NGR234, the lipid A moiety carries a galacturonic acid substitution (revised in De Castro et al. 2008).

In *S. fredii* HH103, glucuronic acid is also present in another surface polysaccharide: the EPS (Rodríguez-Navarro et al. 2014). This was the reason why we decided to investigate the effect of mutations in the *rkp-2* region on EPS production. The HH103 EPS-repeating subunit is composed of glucose, galactose, glucuronic acid and pyruvic acid, in the ratio 5:2:2:1. The two residues of glucuronic acid are located in a lateral branch. Inactivation of *rkpK* did not lead to the synthesis of a modified form of EPS affected in the composition of the lateral branches, but resulted in the complete abolition of EPS production as deduced from both the rough aspect of *rkpK* mutants on YMA plates and the absence of EPS (as determined by NMR) in HH103 *rkpK* YMB cultures. This fact suggests that the synthesis of the appropriate repeating subunit is absolutely required for their assembly. A question to be further investigated is whether the process affected by *rkpK* inactivation could be the transport of the repeating subunits outside of the cell or the polymerization of these subunits into mature EPS.

Inactivation of either *lpsL* or *rkpK* influenced several bacterial traits. We have recently shown that the absence of EPS dramatically reduces the ability of *S. fredii* HH103 to attach and develop a sessile biomass on inert surfaces (Rodríguez-Navarro et al. 2014; Acosta-Jurado et al. 2016b). In agreement with those previous results, the *S. fredii* HH103 *rkpK*, but not the *lpsL*, derivative showed reduced biofilm formation ability. In previous studies, an *exoA* mutant derivative exhibited increased osmosensitivity in MM (Rodríguez-Navarro et al. 2014); in this work, we show that the HH103 *rkpK* derivative not only is negatively affected for the presence of either sucrose or NaCl but also is impaired for growth in MM in the absence of those compounds, indicating that its double defect in surface polysaccharide production (absence of EPS and alteration of LPS) results in high osmosensitivity. On the other hand, the LPS alterations of the *lpsB* or *lpsL* mutants had a similar and moderate impact on HH103 osmosensitivity.

The *rkp-2* mutants also exhibited, in contrast to the wild-type strain, a CF⁺ phenotype when they were cultured on TY plates with calcofluor and exposed under UV conditions. This capacity was stronger in the *lpsL* derivative (SVQ763) than in the *rkpK* mutant (SVQ703). Calcofluor fluorochrome binds to β -linked polysaccharides, more specifically to polymers containing β (1-3)- or β (1-4)-D-glucopyranosyl units (Pérez-Mendoza et al. 2015). Although typically calcofluor binding is related to the EPS, as it is the case for the *S. meliloti* succinoglycan (Finan et al. 1985; Leigh et al. 1985), there are examples of other polysaccharides able to bind this dye, such as a novel mixed-linkage β -glucan recently described in *S. meliloti* (Pérez-Mendoza et al. 2015). Rhizobial LPS, in addition to the O-antigen, contain a core oligosaccharide that can be composed of up to 15 sugar residues (revised in López-Baena et al. 2016). Both the *rkpK* and *lpsL* mutants were affected in their LPS, suggesting that its increased CF-binding ability might be related to their LPS alterations. However, not only that the CF-binding ability of the *lpsL* mutant was higher than that of the *rkpK* derivative, but also that another LPS-altered mutant of HH103, *lpsB*, did not differ from the wild-type strain in this trait. Clearly, further investigation is required to clarify what specific alterations of the LPS are related to CF binding in *S. fredii* HH103. The *S. fredii* HH103 *rkp-2* mutants also differed from their parental strain in their behaviour when cultured on TY supplemented with Congo red. Whereas the wild-type strain grew normally, both the

lpsL and the *rkpK* mutants were severely impaired in their growth in that condition. Interestingly, inactivation of *exoA* but not that of *lpsB* led to the same phenotype. Thus, in *S. fredii* HH103, the absence of EPS and/or some LPS alterations appears to confer sensitivity to the presence of this dye.

Inactivation of *lpsL* and *rkpK* has different effects on the symbiotic performance of *S. fredii* HH103 with the two legumes tested: *G. max* (soybean) and *V. unguiculata* (cowpea). Thus, the *rkpK* mutant SVQ703 is clearly affected with cowpea but does not show any symbiotic defect with soybean. This is an interesting result since HH103 mutants in *rkpU* (affected in KPS and LPS) and *lpsB* (affected in LPS) are more impaired with soybean than with cowpea (Hidalgo et al. 2010; Margaret et al. 2013). Although *rkpK* inactivation affects LPS and avoids EPS production, its symbiotic defect might be most probably associated to the alteration of the LPS since an *exoA* (EPS⁻) derivative of HH103 is not significantly affected in its interaction with cowpea (Hidalgo et al. 2010).

The HH103 *lpsL* mutant SVQ763 showed a dramatic symbiotic impairment with soybean and cowpea. It is remarkable that SVQ763 induced the formation of numerous pseudonodules in soybean but not in cowpea roots. However, cowpea roots, as soybean roots, inoculated with strain SVQ763 developed nodule primordia. In our opinion, this is an expected result since, to our knowledge, nodule primordia formation is dependent on Nod factor and not on LPS perception (Jones et al. 2007; Downie 2010). Regarding the ability to induce root hair deformation, we did not find differences between the wild-type strain and SVQ763 in cowpea. In soybean, however, we did not find clear root hair deformation induced by the *lpsL* mutant. To our knowledge, this is an unexpected result since this response is Nod factor-dependent. Clearly, further research is required to elucidate this point. In fact, rhizobial surface polysaccharides are thought to be especially important for bacterial infection of host roots, either acting as symbiotic signals and/or preventing plant defence responses (Downie 2010; López-Baena et al. 2016). Our confocal microscopy studies suggest that the HH103 *lpsL* derivative was impaired in infection of both cowpea and soybean roots. In the case of soybean, as commented above, this mutant appeared to fail in root entry, and infection threads in progression to the root cortex were not detected, in clear contrast to the situation found for its parental strain. In the case of cowpea, SVQ763 cells could be found inside

roots, but most of them were forming aggregates that were absent in the case of *S. fredii* HH103, suggesting that this LPS mutant might be suffering a plant defence response. In any case, our results are in agreement with the fact that LPS alterations have a deep impact in the symbiotic behaviour of *S. fredii* HH103 with host legumes forming determinate nodules such as soybean and cowpea (reviewed in López-Baena et al. 2016). The degree of the symbiotic impairment appears to depend on the specific LPS alteration and the host legume. Thus, inactivation of *lpsB* (coding for a glycosyl transferase involved in LPS production) led to reduced nodulation with soybean and cowpea (Margaret et al. 2013). *S. fredii* HH103 mutants in the *rkp-3* region (affected in KPS and LPS) are equally impaired in these two host plants and only induced the formation of pseudonodules (Margaret et al. 2012). Thus, to date, the HH103 *lpsL* derivative is the mutant affected in LPS which is more severely impaired in symbiosis. Interestingly, *rkpK* and *lpsL* mutants of *S. meliloti* AK631 (an *exoB* derivative of Rm41) have been reported to exhibit an Inf⁻ (ineffective nodules devoid of bacteria) phenotype in alfalfa, an indeterminate nodule-forming legume (Kereszt et al. 1998). In *S. meliloti*, KPS and EPS can replace each other for effective nodulation with alfalfa, and because of this, the simultaneous absence of KPS and EPS in AK631 *rkpK* can account for an Inf⁻ phenotype. However, AK631 *lpsL*, although devoid of EPS, has a symbiotically active KPS, which suggests that its symbiotic defect is caused by its altered LPS. Moreover, a *lpsL* mutant of *S. meliloti* 1021, although it is able to induce a few nitrogen-fixing nodules in alfalfa, is severely impaired in its interaction with this plant (Keating et al. 2002). In fact, the infection threads formed when alfalfa roots were inoculated with this mutant were altered and aborted prematurely. In addition, recently Mitra et al. (2016) demonstrated that a rhamnose-deficient lipopolysaccharide mutant of *Rhizobium* sp. IRBG74 is defective in root colonization of both *Sesbania cannabina* and wetland rice. All these results indicate that rhizobial LPS can be an important molecular determinant for root colonization of host plants.

An important question remains open: why the symbiotic phenotype of SVQ703 (*rkpK*) and SVQ763 (*lpsL*) is so different if they both showed alterations in the LPS. Although the LPS of these mutants show similar electrophoretic patterns and they both are not recognized by the monoclonal antibody NB6-228.22, most probably

they present different alterations. To elucidate this point, it is necessary to know the chemical structure of the LPS of the wild-type strain and its *rkp-2* mutants. Our group is currently working in this issue. Our first results clearly indicate the presence of galacturonic and glucuronic acid in the LPS of HH103. Taking into account that RkpK would be responsible for the production of glucuronic acid from glucose and that LpsL would produce galacturonic acid from glucuronic acid, the absence of *rkpK* would lead to a LPS devoid of both uronic acids, whereas inactivation of *lpsL* would result in a LPS containing glucuronic but not galacturonic acid. The exact nature of the alteration can be extremely important in signalling molecules. A good example is the recent work of Kelly et al. (2013) and Kawaharada et al. (2015), who showed that truncated forms of *Mesorhizobium loti* EPS were more detrimental for nodulation with *Lotus japonicus* than the complete absence of EPS production by the bacterium. Another interesting fact is that, at least in *S. fredii* HH103, the transcriptional rate of *rkpK* is much higher than that of *lpsL*. The reason for this difference might be a higher requirement of glucuronic acid with respect to galacturonic acid since, taking into account the main surface polysaccharides, GlcA is a component of both LPS and EPS whereas GalA is only present in the LPS.

We have previously reported different studies about HH103 genes whose mutation or overexpression has different effects in the symbiotic performance with soybean and cowpea: *nolR*, *rkpU*, *lpsB* and *exoA* (Vinardell et al. 2004b; Hidalgo et al. 2010; Margaret et al. 2013; Rodríguez-Navarro et al. 2014). The present work constitutes a new example of how the same molecular alteration has very different effects in the interaction with two different host plants, regardless that these plants formed the same kind of nodules (determinate in this case). In other words, the symbiotic relevance of the bacterial molecular signals appears to be related to each specific bacterium–legume interaction rather than to the type of nodule, determinate or indeterminate, formed by the host plant.

Acknowledgments This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (BIO2011-30229 and BIO2016-78409-R) and the Andalusia Government (P07-CVI-07500). SAJ and PNG are recipients of PhD grants from the VPPI of the University of Seville. We thank the Biology and NMR Facilities of the Centro de Investigación, Tecnología e Innovación (CITIUS), of the University of Seville. We also thank Isamar

Moyano for technical assistance. Finally, we are grateful to the three anonymous reviewers who have evaluated this work.

References

- Acosta-Jurado S, Alias-Villegas C, Navarro-Gómez P, Zehner S, Murdoch PD, Rodríguez-Carvajal MA, Soto MJ, Ollero FJ, Ruiz-Sainz JE, Göttfert M, Vinardell JM (2016a) The *Sinorhizobium fredii* HH103 MucR1 global regulator is connected with the *nod* regulon and is required for efficient symbiosis with *Lotus burtii* and *Glycine max* cv. Williams. *Mol Plant-Microbe Interact* 29:700–712
- Acosta-Jurado S, Navarro-Gómez P, Murdoch P d S, Crespo-Rivas JC, Jie S, Cuesta-Berrio L, Ruiz-Sainz JE, Rodríguez-Carvajal MÀ, Vinardell JM (2016b) Exopolysaccharide production by *Sinorhizobium fredii* HH103 is repressed by genistein in a NodD1-dependent manner. *PLoS One* 11:e0160499
- Acosta-Jurado S, Rodríguez-Navarro DN, Kawaharada Y, Perea JF, Gil-Serrano A, Jin H, An Q, Rodríguez-Carvajal MA, Andersen SU, Sandal N, Stougaard J, Vinardell JM, Ruiz-Sainz JE (2016c) *Sinorhizobium fredii* HH103 invades *Lotus burtii* by crack entry in a Nod factor-and surface polysaccharide-dependent manner. *Mol Plant-Microbe Interact* 29:925–937
- Becker A, Schmidt M, Jäger W, Pühler A (1995) New gentamicin-resistance and *lacZ* promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. *Gene* 162:37–39
- Beringer JE (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* 84:188–198
- Buendía-Clavería AM, Moussaid A, Ollero FJ, Vinardell JM, Torres A, Moreno J, Gil-Serrano AM, Rodríguez-Carvajal MA, Tejero-Mateo P, Peart JL, Brewin NJ, Ruiz-Sainz JE (2003) A *purL* mutant of *Sinorhizobium fredii* HH103 is symbiotically defective and altered in its lipopolysaccharide. *Microbiology* 149:1807–1818
- Crespo-Rivas JC, Margaret I, Pérez-Montaño F, López-Baena FJ, Vinardell JM, Ollero FJ, Moreno J, Ruiz-Sainz JE, Buendía-Clavería AM (2007) A *pyrF* auxotrophic mutant of *Sinorhizobium fredii* HH103 impaired in its symbiotic interactions with soybean and other legumes. *Int Microbiol* 10: 169–176
- De Castro C, Molinaro A, Lanzetta R, Silipo A, Parrilli M (2008) Lipopolysaccharide structures from *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Carbohydr Res* 343:1924–1933
- Downie JA (2010) The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol Rev* 34:150–170
- Finan TM, Hirsch AM, Leigh JA, Johansen E, Kuldau GA, Deegan S, Walker GC, Signer ER (1985) Symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti* that uncouple plant from bacterial differentiation. *Cell* 40:869–877
- Gil-Serrano AM, Rodríguez-Carvajal MA, Tejero Mateo P, Espartero JL, Menéndez M, Corzo J, Ruiz-Sainz JE, Buendía-Clavería AM (1999) Structural determination of a 5-acetamido-3,5,7,9-tetra-deoxy-7-(3-hydroxybutyramido)-L-glycero-L-manno-nonulosonic acid-containing

- homopolysaccharide isolated from *Sinorhizobium fredii* HH103. *Biochem J* 342:527–535
- Hidalgo A, Margaret I, Crespo-Rivas JC, Parada M, Murdoch PS, López A, Buendía-Clavería AM, Moreno J, Albareda M, Gil-Serrano AM, Rodríguez-Carvajal MA, Palacios JM, Ruiz-Sainz JE, Vinardell JM (2010) The *rkpU* gene of *Sinorhizobium fredii* HH103 is required for bacterial K-antigen polysaccharide production and for efficient nodulation with soybean but not with cowpea. *Microbiology* 156:3398–3411
- Janczarek M, Rachwał K, Marzec A, Grządziel J, Palusińska-Szys M (2015) Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume–rhizobium interactions. *Appl Soil Ecol* 85:94–113
- Jiménez-Guerrero I, Pérez-Montaña F, Monreal JA, Preston GM, Fones H, Vioque B, Ollero FJ, Lopez-Baena FJ (2015) The *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103 type 3 secretion system suppresses early defense responses to effectively nodulate soybean. *Mol Plant-Microbe Interact* 28:790–799
- Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME, Walker GC (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature Rev Microbiol* 5:619–633
- Kawaharada Y, Kelly S, Nielsen MW, Hjuler CT, Gysel K, Muszyński A, Carlson RW, Thygesen MB, Sandal N, Asmussen MH, Vinther M, Andersen SU, Krusell L, Thirup S, Jensen KJ, Ronson CW, Blaise M, Radutoiu S, Stougaard J (2015) Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature* 523:308–312
- Kawaharada Y, Nielsen MW, Kelly S, James EK, Andersen KR, Rasmussen SR, Füchtbauer W, Madsen LH, Heckmann AB, Radutoiu S, Stougaard J (2017) Differential regulation of the *Epr3* receptor coordinates membrane-restricted rhizobial colonization of root nodule primordia. *Nat Commun* 8:14534
- Keating DH, Willits MG, Long SR (2002) A *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant altered in cell surface sulfation. *J Bacteriol* 184:6681–6689
- Kelly SJ, Muszyński A, Kawaharada Y, Hubber AM, Sullivan JT, Sandal N, Carlson RW, Stougaard J, Ronson CW (2013) Conditional requirement for exopolysaccharide in the *Mesorhizobium-Lotus* symbiosis. *Mol Plant-Microbe Interact* 26:319–329
- Kereszt A, Kiss E, Reuhs BL, Carlson RW, Kondorosi A, Putnoky P (1998) Novel *rkp* gene clusters of *Sinorhizobium meliloti* involved in capsular polysaccharide production and invasion of the symbiotic nodule: the *rkpK* gene codes a UDP-glucose dehydrogenase. *J Bacteriol* 180:5426–5431
- Kiss E, Kereszt A, Barta F, Stephens S, Reuhs BL, Kondorosi A, Putnoky P (2001) The *rkp-3* gene region of *Sinorhizobium meliloti* Rm41 contains strain-specific genes that determine K antigen structure. *Mol Plant-Microbe Interact* 14:1395–1403
- Kondorosi E, Mergaert P, Kereszt A (2013) A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of *Rhizobium* bacteria provoked by host plant factors. *Annu Rev Microbiol* 67:611–628
- Leigh A, Signer ER, Walker GC (1985) Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:6231–6235
- López-Baena FJ, Monreal JA, Pérez-Montaña F, Guasch-Vidal B, Bellogín RA, Vinardell JM, Ollero FJ (2009) The absence of Nops secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103 increases GmPR1 expression in Williams soybean. *Mol Plant-Microbe Interact* 22:1445–1454
- López-Baena FJ, Ruiz-Sainz JE, Rodríguez-Carvajal MA, Vinardell JM (2016) Bacterial molecular signals in the *Sinorhizobium fredii*-soybean symbiosis. *Int J Mol Sci* 17:E755
- Margaret I, Becker A, Blom J, Bonilla I, Goesmann A, Göttfert M, Lloret J, Mittard-Runte V, Rückert C, Ruiz-Sainz JE, Vinardell JM, Weidner S (2011) Symbiotic properties and first analyses of the genomic sequence of the fast growing model strain *Sinorhizobium fredii* HH103 nodulating soybean. *J Biotechnol* 155:11–19
- Margaret I, Crespo-Rivas JC, Acosta-Jurado S, Buendía-Clavería AM, Cubo MT, Gil-Serrano A, Moreno J, Murdoch PS, Rodríguez-Carvajal MA, Rodríguez-Navarro DN, Ruiz-Sainz JE, Sanjuán J, Soto MJ, Vinardell JM (2012) *Sinorhizobium fredii* HH103 *rkp-3* genes are required for K-antigen polysaccharide biosynthesis, affect lipopolysaccharide structure and are essential for infection of legumes forming determinate nodules. *Mol Plant-Microbe Interact* 25:825–838
- Margaret I, Lucas MM, Acosta-Jurado S, Buendía-Clavería AM, Fedorova E, Hidalgo A, Rodríguez-Carvajal MA, Rodríguez-Navarro DN, Ruiz-Sainz JE, Vinardell JM (2013) The *Sinorhizobium fredii* HH103 lipopolysaccharide is not only relevant at early soybean nodulation stages but also for symbiosome stability in mature nodules. *PLoS One* 8:e74717
- Margaret-Oliver I, Lei W, Parada M, Rodríguez-Carvajal MA, Crespo-Rivas JC, Hidalgo A, Gil-Serrano A, Moreno J, Rodríguez-Navarro DN, Buendía-Clavería A, Ollero J, Ruiz-Sainz JE, Vinardell JM (2012) *Sinorhizobium fredii* HH103 does not strictly require KPS and/or EPS to nodulate *Glycyrrhiza uralensis*, an indeterminate nodule-forming legume. *Arch Microbiol* 194:87–102
- Meyer F, Goesmann A, McHardy AC, Bartels D, Bekel T, Clausen J, Kalinowski J, Linke B, Rupp O, Giegerich R, Pühler A (2003) GenDB—an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Res* 31:2187–2195
- Mitra S, Mukherjee A, Wiley-Kalil A, Das S, Owen H, Reddy PM, Ané JM, James EK, Gyaneshwar P (2016) A rhamnose-deficient lipopolysaccharide mutant of *Rhizobium* sp. IRBG74 is defective in root colonization and beneficial interactions with its flooding-tolerant hosts *Sesbania cannabina* and wetland rice. *J Exp Bot* 67:5869–5884
- O'Toole GA, Kolter R (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28:449–461
- Parada M, Vinardell JM, Ollero FJ, Hidalgo A, Gutiérrez R, Buendía-Clavería AM, Lei W, Margaret I, López-Baena FJ, Gil-Serrano AM, Rodríguez-Carvajal MA, Moreno J, Ruiz-Sainz JE (2006) *Sinorhizobium fredii* HH103 mutants affected in capsular polysaccharide (KPS) are impaired for nodulation with soybean and *Cajanus cajan*. *Mol Plant-Microbe Interact* 19:43–52
- Pérez-Mendoza D, Rodríguez-Carvajal MÁ, Romero-Jiménez L, Farias GA, Lloret J, Gallegos MT, Sanjuán J (2015) Novel mixed-linkage β -glucan activated by c-di-GMP in

- Sinorhizobium meliloti*. Proc Natl Acad Sci U S A 112:E757–E765
- Pérez-Montaño F, Jiménez-Guerrero I, Acosta-Jurado S, Navarro-Gómez P, Ollero FJ, Ruiz-Sainz JE, López-Baena FJ, Vinardell JM (2016) A transcriptomic analysis of the effect of genistein on *Sinorhizobium fredii* HH103 reveals novel rhizobial genes putatively involved in symbiosis. Sci Rep 6: 31592
- Putnoky P, Petrovics G, Kereszt A, Grosskopf E, Ha DT, Banfalvi Z, Kondorosi A (1990) *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide and exopolysaccharide can have the same function in the plant-bacterium interaction. J Bacteriol 172:5450–5458
- Reuhs BL, Geller DP, Kim JS, Fox JE, Kolli VSK, Pueppke SG (1998) *Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium meliloti* produce structurally conserved lipopolysaccharides and strain-specific K antigens. Appl Environ Microbiol 64:4930–4938
- Rodríguez-Navarro DN, Rodríguez-Carvajal MA, Acosta-Jurado S, Soto MJ, Margaret I, Crespo-Rivas JC, Sanjuan J, Temprano F, Gil-Serrano A, Ruiz-Sainz JE, Vinardell JM (2014) Structure and biological roles of *Sinorhizobium fredii* HH103 exopolysaccharide. PLoS One 9:e115391
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Simon R (1984) High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the *in vivo* constructed Tn5-Mob transposon. Mol Gen Genet 196:413–420
- Solovyev V, Salamov A (2011) Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences. In: Li RW (ed) Metagenomics and its applications in agriculture, biomedicine and environmental studies. Nova Science Publishers, New York, pp 61–78
- Sorroche FG, Spesia MB, Zorreguieta A, Giordano W (2012) A positive correlation between bacterial autoaggregation and biofilm formation in native *Sinorhizobium meliloti* isolates from Argentina. Appl Environ Microbiol 78:4092–4101
- Thomas-Oates J, Bereszczak J, Edwards E, Gill A, Noreen S, Zhou JC, Chen MZ, Miao LH, Xie FL, Yang JK, Zhou Q, Yang SS, Li XH, Wang L, Spaink HP, Schlaman HR, Harteveld M, Díaz CL, van Brussel AA, Camacho M, Rodríguez-Navarro DN, Santamaría C, Temprano F, Acebes JM, Bellogín RA, Buendía-Clavería AM, Cubo MT, Espuny MR, Gil AM, Gutiérrez R, Hidalgo A, López-Baena FJ, Madinabeitia N, Medina C, Ollero FJ, Vinardell JM, Ruiz-Sainz JE (2003) A catalogue of molecular, physiological and symbiotic properties of soybean-nodulating rhizobial strains from different soybean cropping areas of China. Syst Appl Microbiol 26:453–465
- Vinardell JM, López-Baena FJ, Hidalgo A, Ollero FJ, Bellogín R, Espuny MR, Temprano F, Romero F, Krishnan HB, Pueppke SG, Ruiz-Sainz JE (2004a) The effect of FITA mutations on the symbiotic properties of *Sinorhizobium fredii* varies in a chromosomal-background-dependent manner. Arch Microbiol 181:144–154
- Vinardell JM, Ollero FJ, Hidalgo A, López-Baena FJ, Medina C, Ivanov-Vangelov K, Parada M, Madinabeitia N, Espuny MR, Bellogín RA, Camacho M, Rodríguez-Navarro DN, Soria-Díaz ME, Gil-Serrano AM, Ruiz-Sainz JE (2004b) NodR regulates diverse symbiotic signals of *Sinorhizobium fredii* HH103. Mol Plant-Microbe Interact 17:676–685
- Vinardell JM, Acosta-Jurado S, Göttfert M, Zehner S, Becker A, Baena-Ropero I, Blom J, Crespo-Rivas JC, Goesmann A, Jaenicke S, Krol E, McIntosh M, Margaret I, Pérez-Montaño F, Schneiker-Bekel S, Serrania J, Szczepanowski R, Buendía-Clavería AM, Lloret J, Bonilla I, Pühler A, Ruiz-Sainz JE, Weidner S (2015) The *Sinorhizobium fredii* HH103 genome: a comparative analysis with *S. fredii* strains differing in their symbiotic behaviour with soybean. Mol. Plant-Microbe Interact 28:811–824
- Vincent JM (1970) Appendix III. The modified Fåhræus slide technique. In: A manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 144–145
- Weidner S, Becker A, Bonilla I, Jaenicke S, Lloret J, Margaret I, Pühler A, Ruiz-Sainz JE, Schneiker-Bekel S, Szczepanowski R, Vinardell JM, Zehner S, Göttfert M (2012) Genome sequence of the soybean symbiont *Sinorhizobium fredii* HH103. J Bacteriol 194:1617–1618
- Westphal O, Jann K (1965) Bacterial lipopolysaccharides, extraction with phenol-water and further application of the procedure. Meth Carbohydr Chem 5:83–91
- Zehner S, Schober G, Wenzel M, Lang K, Göttfert M (2008) Expression of the *Bradyrhizobium japonicum* type III secretion system in legume nodules and analysis of the associated *its* box promoter. Mol Plant-Microbe Interact 21:1087–1093

Capítulo II:

Acosta-Jurado, S., Rodríguez-Navarro, D.N., Kawaharada, Y., Perea, J.F., Gil-Serrano, A., Jin, H., An Q, Rodríguez-Carvajal, M.A., Andersen, S.U., Sandal, N., Stougaard, J., Vinardell, J.M., Ruiz-Sainz, J.E. 2016a. *Sinorhizobium fredii* HH103 invades *Lotus burtii* by crack entry in a nod factor-and surface polysaccharide-dependent manner. Mol Plant Microbe Interact. 29:925-937.

***Sinorhizobium fredii* HH103 Invades *Lotus burtii* by Crack Entry in a Nod Factor– and Surface Polysaccharide–Dependent Manner**

Sebastián Acosta-Jurado,¹ Dulce-Nombre Rodríguez-Navarro,² Yasuyuki Kawaharada,³ Juan Fernández Perea,² Antonio Gil-Serrano,⁴ Haojie Jin,³ Qi An,¹ Miguel A. Rodríguez-Carvajal,⁴ Stig U. Andersen,³ Niels Sandal,³ Jens Stougaard,³ José-María Vinardell,¹ and José E. Ruiz-Sainz¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avda. Reina Mercedes 6, C.P. 41012, Sevilla, Spain; ²IFAPA, Centro Las Torres-Tomejil, Apartado Oficial 41200, Alcalá del Río, Sevilla, Spain; ³Department of Molecular Biology and Genetics, Centre for Carbohydrate Recognition and Signalling, Aarhus University, Gustav Wieds Vej 10, Aarhus C DK-8000, Denmark; and ⁴Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Calle Profesor García González 1, C. P. 41012, Sevilla, Spain

Accepted 2 July 2016.

Sinorhizobium fredii HH103-Rif^r, a broad host range rhizobial strain, induces nitrogen-fixing nodules in *Lotus burtii* but ineffective nodules in *L. japonicus*. Confocal microscopy studies showed that *Mesorhizobium loti* MAFF303099 and *S. fredii* HH103-Rif^r invade *L. burtii* roots through infection threads or epidermal cracks, respectively. Infection threads in root hairs were not observed in *L. burtii* plants inoculated with *S. fredii* HH103-Rif^r. A *S. fredii* HH103-Rif^r *nodA* mutant failed to nodulate *L. burtii*, demonstrating that Nod factors are strictly necessary for this crack-entry mode, and a *noeL* mutant was also severely impaired in *L. burtii* nodulation, indicating that the presence of fucosyl residues in the Nod factor is symbiotically relevant. However, significant symbiotic impacts due to the absence of methylation or to acetylation of the fucosyl residue were not detected. In contrast *S. fredii* HH103-Rif^r mutants showing lipopolysaccharide alterations had reduced symbiotic capacity, while mutants affected in production of either exopolysaccharides, capsular polysaccharides, or both were not impaired in nodulation. Mutants unable to produce cyclic glucans and purine or pyrimidine auxotrophic mutants formed ineffective nodules with *L. burtii*. Flagellin-dependent bacterial mobility was not required for crack infection, since HH103-Rif^r *fla* mutants nodulated *L. burtii*. None of the *S. fredii* HH103-Rif^r surface-polysaccharide mutants gained effective nodulation with *L. japonicus*.

enormous ecological and economic importance of legume crops explains why so many extensive studies on the rhizobial-legume symbiosis have been carried out during the last four decades.

Sinorhizobium fredii is a rhizobial species that has an extremely broad host range. Pueppke and Broughton (1999) showed that *S. fredii* NGR234 nodulates more than 100 genera of legumes and that *S. fredii* USDA257 nodulates a subset of the legumes nodulated by *S. fredii* NGR234. *S. fredii* HH103-Rif^r host range has not been studied in such a detail, but it seems to be closer to that of USDA257 (Buendía-Clavería et al. 1989; Margaret et al. 2011). However, the HH103-Rif^r host range of nodulation shows some significant differences in respect to that of NGR234 and USDA257. For instance, *S. fredii* HH103-Rif^r is able to induce nitrogen-fixing nodules with commercial American soybean cultivars, while *S. fredii* NGR234 and *S. fredii* USDA257 only form ineffective nodules (Buendía-Clavería et al. 1994; Dowdle and Bohlool 1985; Pueppke and Broughton 1999).

Regardless of the rhizobial species that infect *Glycine max* or *Lotus* roots, all the nodules formed are spherical and devoid of an apical meristem. Spherical nodules are also called “determinate nodules” and appear in many other legumes such as *Phaseolus vulgaris* or *Vigna unguiculata*. *L. japonicus* is the model legume used for studying signal exchange and morphogenesis of determinate nodules. *S. fredii* strains are able to nodulate *Glycine* and *Lotus* spp. (Pueppke and Broughton 1999), which offers the possibility for carrying out comparative nodulation studies on these two important legumes. We have previously reported that *Sinorhizobium fredii* HH103-Rif^r is able to induce the formation of nitrogen-fixing nodules on *L. burtii* roots but only ineffective nodules on *L. japonicus* ecotypes Gifu and Miyakojima MG-20 (Sandal et al. 2012). These species are closely related members of the *Lotus corniculatus* clade (Degtjareva et al. 2008; Sz.-Borsos et al. 1972). Three bacterial compatibility groups interacting with members of the genus *Lotus* have been identified. Group 1 is composed of *Mesorhizobium* strains that can efficiently nodulate *L. japonicus*, *L. filicaulis*, *L. burtii*, *L. glaber*, and *L. corniculatus*. Group 2 is composed of *Bradyrhizobium* strains that nodulate *L. pedunculatus* (Gossmann et al. 2012). Group 3 is formed by strains that nodulate both *L. pedunculatus* and *L. corniculatus* (Ward et al. 1989).

Rhizobial Nod factors induce plant responses and facilitate bacterial infection, leading to the development of nitrogen-fixing root nodules on host legumes. Nodule initiation is highly

Rhizobia are α - and β -proteobacteria that are able to establish nitrogen-fixing symbioses with legumes (Peix et al. 2015). The

S. Acosta-Jurado and D.-N. Rodríguez-Navarro contributed equally to this work.

Current address for Q. An: Department of Resources and Environmental Microbiology, Institute of Microbiology, Heilongjiang Academy of Sciences. No. 68, Zhaolin Street, Daoli District, Harbin, Heilongjiang Province, China.

Corresponding author: J.-M. Vinardell; Telephone: +34-954554330; Fax: +34-954557830; E-mail: jvinar@us.es

*The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates that five supplementary figures and five supplementary tables are published online.

dependent on Nod factor structure (Downie 2010). Most of the studies focused on the nodulation process of *L. japonicus* have been carried out using *Mesorhizobium loti* as the micro-symbiont partner (Bek et al. 2010; Sullivan and Ronson 1998; Sullivan et al. 1995). Many *Mesorhizobium loti* R7A nod mutants have been tested for their symbiotic capacity with different *Lotus* species (Rodpohong et al. 2009). Only mutants affected in *nodA*, *nodC*, and the double mutant *nodD1 nodD2* failed to induce nodule formation. Mutants in the transcriptional regulator *nodD1* induced delayed effective nodules on *L. japonicus* and *L. corniculatus*. Mutants in *nodB*, *nodD2*, *nodM*, *nodO*, *nodS*, and the double mutant *nodO nodS* (it produces Nod factors devoid of the carbamoyl and the *N*-methyl groups on the nonreducing terminal residue) formed nitrogen-fixing nodules on *L. japonicus* and *L. corniculatus* with the same nodulation kinetics as wild-type R7A. In contrast, R7A *nodZ* and *nolL* mutants produce Nod factors without the (acetyl)fucose on the reducing terminal residue and formed delayed effective nodules on *L. japonicus* and uninfected nodule primordia on *L. filicaulis* and *L. corniculatus*. In *L. burtii*, however, the symbiotic properties of *M. loti* R7A and its mutant derivatives *nodZ* and *nolL* were indistinguishable (Rodpohong et al. 2009). Another report has shown that the production of (acetyl)fucosylated Nod factors by a *Rhizobium leguminosarum* isolate from *L. corniculatus* nodules is not required for the formation of infected nodules on *L. burtii* roots (Gossmann et al. 2012).

Other bacterial components that can play a role as symbiotic signals are the diverse bacterial surface polysaccharides present in the different rhizobial species: exopolysaccharides (EPS), capsular K-antigen polysaccharides (KPS), cyclic glucans (CG), and lipopolysaccharides (LPS). The relative symbiotic importance of each particular surface polysaccharide varies among the specific partners (rhizobia and legume) composing the symbiotic partnership (Downie 2010). *M. loti* EPS appears to play a signaling role at the stage of both infection thread (IT) initiation and bacterial release (Kelly et al. 2013). A more recent report shows that the *L. japonicus Epr3* gene encodes a receptor-like kinase that perceives *M. loti* EPS. *Epr3* expression is inducible and induction is dependent on Nod factors. Thus legume-rhizobia symbiotic compatibility and bacterial access to *L. japonicus* roots is regulated by the recognition of Nod factors and EPS signals (Kawaharada et al. 2015).

Information about *M. loti* capsular polysaccharides (KPS) is very limited and does not provide strong evidence for a possible symbiotic role of this surface polysaccharide. *M. loti* NZP2235 produces a capsular polysaccharide (KPS) of unknown structure. This KPS contains sulfate modifications carried out by KpsS, a sulphotransferase. Although NZP2235 *kpsS* mutants exhibited undetectable levels of KPS sulphation, the number of nodules formed on *L. japonicus* roots was similar to that induced by the wild-type strain (Townsend and Keating 2008; Townsend et al. 2006).

M. loti MAFF303099 *cgs* (*ndvB*) mutants do not produce cyclic β -1,2-glucans (Kawaharada et al. 2007, 2008) and are unable to induce the formation of ITs on *Leuresthes tenuis* (nowadays called *L. glaber* Mill.), indicating that *M. loti* requires CG for the infection of *Lotus* roots (D'Antuono et al. 2005). Other reports have shown, however, that the anionic substituents of the *M. loti* CG are not important for the symbiotic bacterial capacity with *L. japonicus* ecotype Gifu (Kawaharada et al. 2010).

The symbiotic capacity of two different *M. loti* mutants affected in LPS production has been studied. The *M. loti lpsB1* mutant produces LPS totally devoid of O-antigen, while the *lpsB2* mutant produces LPS with a reduced amount of O-antigen. Although both LPS mutants elicited normal nodules on *L. tenuis* roots, they showed severe reduction in competitiveness when compared with the parental wild-type strain (D'Antuono et al. 2005).

The genome sequence of *S. fredii* HH103 has been determined (Vinardell et al. 2015) and deposited in the European Molecular Biology Laboratory Nucleotide Sequence database. The chemical structure of symbiotic signals produced by *S. fredii* HH103-Rif^r, such as Nod factors and diverse surface polysaccharides, have been previously reported (Gil-Serrano et al. 1997; Hidalgo et al. 2010; Margaret-Oliver et al. 2012; Margaret et al. 2012, 2013; Parada et al. 2006; Rodríguez-Navarro et al. 2014).

To our knowledge, this work describes, for the first time, the symbiotic phenotypes of a collection of *S. fredii* HH103-Rif^r mutants with the model legume *L. japonicus* and *L. burtii*. These bacterial mutants are affected in the chemical structure of Nod factors and also in the production of four different bacterial surface polysaccharides, i.e., CG, EPS, KPS, and LPS. Other HH103-Rif^r mutants, such as purine and pyrimidine auxotrophic (*pur* and *pyr*) mutants or those devoid of flagella-dependent motility (*fla* mutant) were also investigated. Only *S. fredii* HH103-Rif^r mutants unable to produce Nod factors or CG and *pur* and *pyr* mutants failed to nodulate *L. burtii*. It is also concluded that mutations affecting HH103-Rif^r LPS may reduce bacterial nodulation capacity with *L. burtii*. Confocal microscopy studies showed that *Mesorhizobium loti* MAFF303099 invades *L. burtii* roots by ITs formed in root hairs, while *S. fredii* HH103-Rif^r invades *L. burtii* roots through crack entry infections.

RESULTS

Nodulation host-range of *S. fredii* HH103-Rif^r with different *Lotus* species.

S. fredii HH103-Rif^r forms nitrogen-fixing nodules with *L. burtii* but only nodules devoid of bacteria with *L. japonicus* ecotype Gifu (Sandal et al. 2012). Nodulation tests were carried out to further investigate the symbiotic capacity of *S. fredii* HH103-Rif^r with other *Lotus* species belonging to different clades of the *Lotus* genus (Degtareva et al. 2008). *L. japonicus* Gifu and *L. burtii* (*Lotus corniculatus* clade) plants were used as negative and positive symbiotic controls, respectively. *S. fredii* HH103-Rif^r failed to form nitrogen-fixing nodules with members of all clades tested: Pedrosia clade (*L. creticus* and *L. arenarius*), Lotea clade (*L. cytisoides*), Pedunculatus clade (*L. uliginosus*), and Corniculatus clade (*L. japonicus* ecotypes Gifu and Miyakojima MG-20, *L. filicaulis*, *L. corniculatus*, *L. glaber*, and *L. krylovii*). Root outgrowths, varying from elongated root zones to hemispherical structures, were observed in all or some individual plants of the *Lotus* species tested. White ineffective nodules were occasionally observed in *L. filicaulis* and *L. japonicus*. Hence, in our experimental conditions only *L. burtii* plants formed an effective symbiosis with *S. fredii* HH103-Rif^r (Supplementary Table S1). However, *L. burtii* plants inoculated with *S. fredii* HH103-Rif^r were smaller (Supplementary Fig. S1) and the number of nodules formed was slightly lower than that formed by *Mesorhizobium loti* NZP2235 (19.5 ± 6.3 and 25.1 ± 7.8 , respectively). In addition, *S. fredii* HH103-Rif^r was clearly outcompeted by *M. loti* NZP2235 to nodulate *L. burtii* plants, since the former only occupied 2 and 4% of the nodules induced in two independent competition experiments (Supplementary Table S2).

Symbiotic capacity of *S. fredii* HH103-Rif^r surface polysaccharides mutants with *L. japonicus* Gifu and *L. burtii*.

Nodulation tests with *L. japonicus* and *L. burtii* were carried out to investigate the symbiotic capacity of diverse *S. fredii* HH103-Rif^r mutants affected in surface polysaccharides (EPS, KPS, LPS, and CG) that are known to play a role in rhizobia-legume interactions. Figure 1 summarizes the chemical structures already determined and the genetic regions mutated in the different *S. fredii* HH103-Rif^r mutants studied in this work. At

least two independent symbiotic tests were carried out for each *S. fredii* HH103-Rif^r mutant investigated in this work.

EPS mutants.

S. fredii SVQ530, an *exoA* mutant derivative of *S. fredii* HH103-Rif^r unable to produce EPS (Parada et al. 2006;

Rodríguez-Navarro et al. 2014), formed pink nitrogen-fixing nodules on *L. burtii* roots (Table 1; Fig. 1; Supplementary Fig. S2, panel B). Development of *L. burtii* plants (assessed as shoot height or plant-top fresh weight) inoculated with SVQ530 (15.0 ± 0.9 cm) were similar to those shown by plants inoculated with the parental strain *S. fredii* HH103-Rif^r (14.6 ±

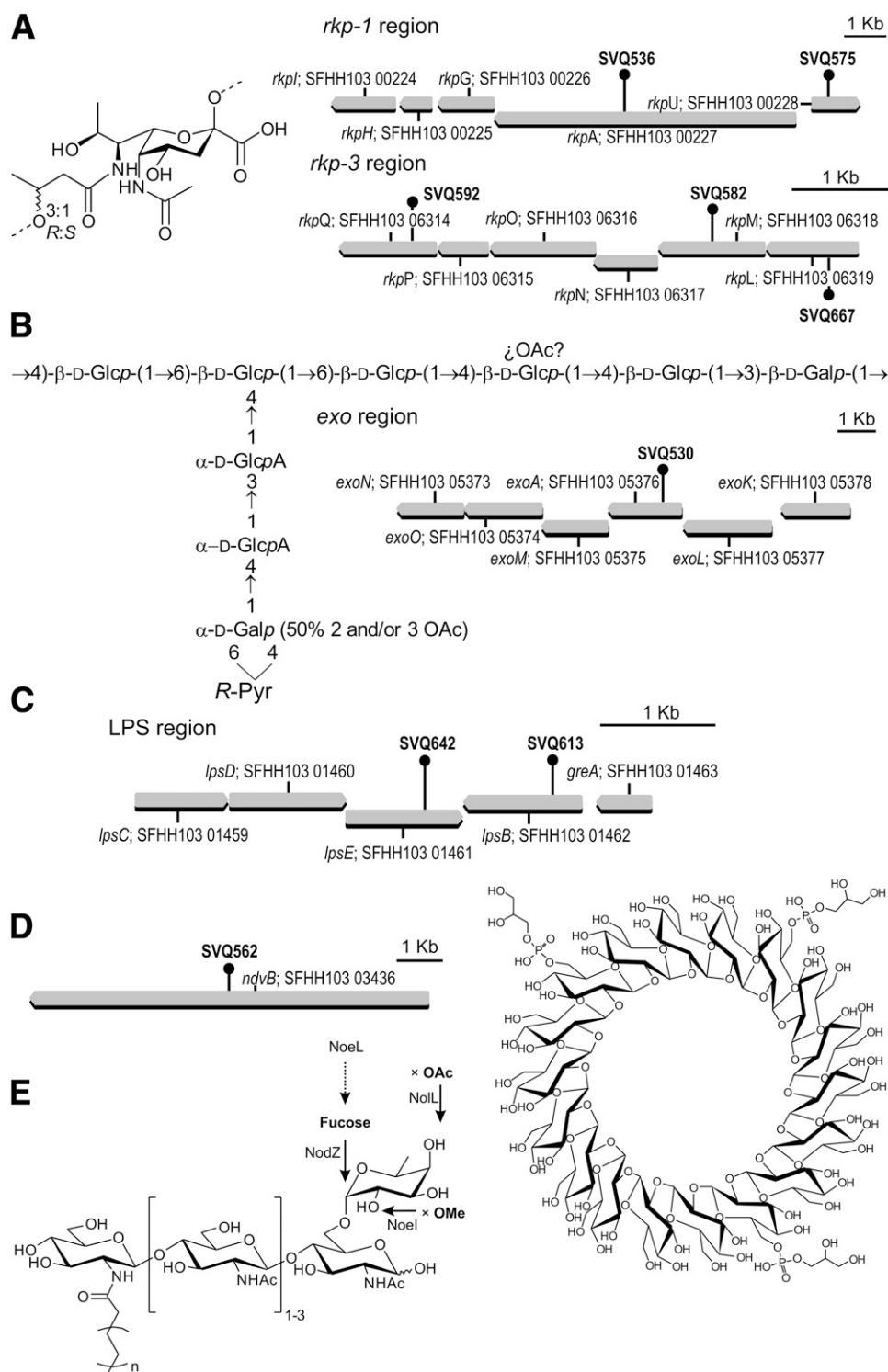


Fig. 1. Chemical structures of *Sinorhizobium fredii* HH103-Rif^r surface polysaccharides and Nod factors and mapping of the mutated genes studied in this work. **A**, Chemical structure of the K-antigen polysaccharide repeating unit and genes of the *rkp-1* and *rkp-3* regions. **B**, Chemical structure of the exopolysaccharide repeating unit and a fragment of the *exo* region containing *exoA*. **C**, Genetic organization of the *lpsCDElpsBgreA* region. **D**, Chemical structure of a cyclic glucan composed of 18 glucosyl residues, the positions of the phosphoglycerol substituents have not been determined and a fragment of the chromosome containing the *ndvB* (also called *cgs*) gene. **E**, General structure of *S. fredii* HH103-Rif^r Nod factor; arrows indicated the position at which the transferases NodZ y Noel add the fucosyl residue and the methyl substituent, respectively. The position at which the *Mesorhizobium loti* Noll transferase adds the acetyl substituent is also indicated.

0.7 cm) at 59 days after inoculation (dai). Shoots of uninoculated *L. burtii* plants reached an average height of 2.1 ± 0.7 cm. The kinetics of nodulation of *L. burtii* plants inoculated with SVQ530 and HH103-Rif^r were also similar at 35 dai (Fig. 2, panel A). *L. japonicus* Gifu plants inoculated with SVQ530 failed to form nitrogen-fixing nodules, although macroscopic root outgrowths (MRO) were visible in some plants (Supplementary Fig. S4E and F).

Mutants affected in EPS and LPS.

S. fredii SVQ703 is mutated in a gene homologous to the *S. meliloti* *rpkK* gene, which codes for a UDP-glucose 6-dehydrogenase that catalyzes the conversion of UDP-glucose into UDP-glucuronic acid (Kereszt et al. 1998). Mutant SVQ703 fails in EPS production and shows an altered LPS profile in polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) experiments (Table 1; Supplementary Fig. S3). *L. burtii* responses to inoculation with SVQ703 were equal to those obtained in plants inoculated with the parental strain *S. fredii* HH103-Rif^r (Table 1). *L. burtii* plants inoculated with SVQ703 or HH103-Rif^r were neither significantly different in the number of nodules formed (23.5 ± 1.2 and 22.2 ± 3.2 nodules per plant, respectively) nor in the height of plant tops (14.2 ± 1.0 and 17.0 ± 2.0 cm, respectively) at 59 dai. *L. japonicus* Gifu plants inoculated with SVQ703 only formed MRO structures and plants were not different from uninoculated controls (Table 1).

KPS mutants.

S. fredii SVQ536 contains a mutation in the *rpkA* gene of the *rpk-1* region (Fig. 1A) and fails to produce the capsular homopolysaccharide (KPS) composed of a pseudaminic acid derivative (Margaret-Oliver et al. 2012). The kinetics of nodulation (Fig. 2B) and the total number of nodules formed in plants inoculated with SVQ536 or HH103-Rif^r were similar. *L. burtii* plants inoculated with SVQ536 or HH103-Rif^r

developed green plant tops and the height of all plant shoots was similar (11.5 ± 1.3 and 14.5 ± 1.0 cm, respectively), so that the symbiotic phenotype assigned was Nod⁺ Fix⁺ (Table 1). Mutant SVQ536 did not form nitrogen-fixing nodules with *L. japonicus* Gifu, although MRO structures were observed.

Mutants affected in KPS and LPS.

S. fredii SVQ575 carries a mutation in the *rpkU* gene of the *S. fredii* HH103-Rif^r *rpk-1* region (Hidalgo et al. 2010). This mutant does not produce KPS, and its LPS electrophoretic profile is slightly altered in comparison with that of *S. fredii* HH103-Rif^r. These SVQ575 LPS profile alterations are not detectable in 3-day-old cultures (early stationary phase) but in 5-day late stationary phase cultures (Hidalgo et al. 2010). Mutant SVQ575 formed nitrogen-fixing nodules with *L. burtii* and the height of plants inoculated with SVQ575 (13.3 ± 1.0 cm) was similar to that of plants inoculated with HH103-Rif^r (14.5 ± 1.0 cm).

S. fredii SVQ582 (*rpkM*) is mutated in the *rpk-3* region (Fig. 1A), fails to produce KPS and its LPS electrophoretic pattern is altered in comparison with that of HH103-Rif^r (Margaret et al. 2012). *L. burtii* plants inoculated with SVQ582 formed nitrogen-fixing nodules. The kinetics of nodulation of SVQ582 in *L. burtii* plants was delayed in comparison with that of HH103-Rif^r, although the total number of nodules formed by both strains was similar at 36 dai (Fig. 2C). However, at 59 dai, nodulation (15.7 ± 3.3 nodules per plant) and shoot height (9.3 ± 3.1 cm) of *L. burtii* plants inoculated with SVQ582 was reduced in comparison with plants inoculated with HH103-Rif^r (22.2 ± 3.2 nodules per plant; 14.5 ± 1.0 cm shoot-height). This decrease of the symbiotic capacity of SVQ582 with *L. burtii* was further confirmed in another nodulation test (64 dai), in which the shoot fresh weight of plants inoculated with SVQ582 was only 44% of that shown by plants inoculated with HH103-Rif^r. Other mutants of the *rpk-3* region affected in *rpkQ* (SVQ592 and SVQ594), which show an LPS electrophoretic

Table 1. *Lotus burtii* and *L. japonicus* Gifu responses to inoculation with *Sinorhizobium fredii* HH103-Rif^r mutants affected in bacterial polysaccharides and *Mesorhizobium loti* NZP2235

Mutant strain and gene mutated ^x	Surface polysaccharide affected ^y	Symbiotic phenotype ^z (number of plants tested)		
		<i>L. burtii</i>	<i>L. japonicus</i> MRO	
			Elongated root outgrowths	Hemispherical structures
HH103-Rif ^r	Wild type EPS, KPS, LPS, and CG are produced	Nod ⁺ Fix ⁺ (44)	X	X
SVQ530 <i>exoA</i>	EPS ⁻	Nod ⁺ Fix ⁺ (37)	X	x
SVQ536 <i>rpkA</i>	KPS ⁻	Nod ⁺ Fix ⁺ (23)	X	X
SVQ575 <i>rpkU</i>	KPS ⁻ LPS*	Nod ⁺ Fix ⁺ (10)	X	X
SVQ535 <i>exoA rpkH</i>	EPS ⁻ KPS ⁻	Nod ⁺ Fix ⁺ (18)	X	X
SVQ582 <i>rpkM</i>	KPS ⁻ LPS*	Nod ^R Fix ^R (45)	X	x
SVQ594 <i>rpkQ</i>	KPS ⁻ LPS*	Nod ^R Fix ^R (23)	X	x
SVQ703 <i>rpkK</i>	EPS ⁻ LPS*	Nod ⁺ Fix ⁺ (37)	X	x
SVQ613 <i>lpsB</i>	LPS*	Nod ⁺ Fix ^{R*} (27)	X	X
SVQ642 <i>lpsE</i>	LPS*	Nod ⁺ Fix ⁺ (11)	X	X
SVQ562 <i>cgs</i>	CG ⁻ EPS ^{++s}	MRO and ineffective nodules (48)	X	x
<i>M. loti</i> NZP2235	Wild type	Nod ⁺ Fix ⁺ (55)	Nod ⁺ Fix ⁺ (56)	

^x Mutations were induced by insertion of the *lacZΔp-Gm^r* cassette or the omega interposon.

^y EPS⁻ = exopolysaccharide (EPS) is not produced; KPS⁻ = K-antigen capsular polysaccharide (KPS) is not produced; LPS* = the lipopolysaccharides (LPS) electrophoretic profile is altered in comparison with that of HH103-Rif^r; altered LPS profiles vary among the different mutants analyzed. CG⁻ = cyclic glucans are not produced. EPS^{++s} = the mutant overproduces EPS of higher molecular weight and bears a higher level of pyruvate and acetate substituents than that of HH103-Rif^r.

^z MRO = macroscopic root outgrowths. Symbiotic phenotypes with *L. burtii* and *L. japonicus* Gifu are deduced from at least two independent experiments. Nod⁺ Fix⁺, nitrogen-fixing nodules are formed and plant development (assessed as plant height or plant-top fresh weight) was similar to those of plants inoculated with *S. fredii* HH103-Rif^r. Nod^R Fix^R, the number of nodules and plant development is significantly lower ($\alpha = 5\%$) than that obtained with HH103-Rif^r. Nod⁺ Fix^{R*}, the number of nodules is similar but plant-development is significantly reduced and statistical differences (at $\alpha = 5\%$) were found in at least one experiment. Roots forming ineffective (Fix⁻) nodules can also show macroscopic root outgrowths (MRO) that vary from elongated root zones to hemispherical structures. An upper case X indicates an MRO observed in at least two different experiments; a lower case x indicates an MRO observed in at least one experiment. Many nodules induced in *L. burtii* were pink but green or white nodules can also be observed. Numbers in brackets refer to the total number of plants tested in the different plant assays. Plants were grown in Leonard jars. Nodulation phenotypes were scored 6 to 9 weeks postinoculation.

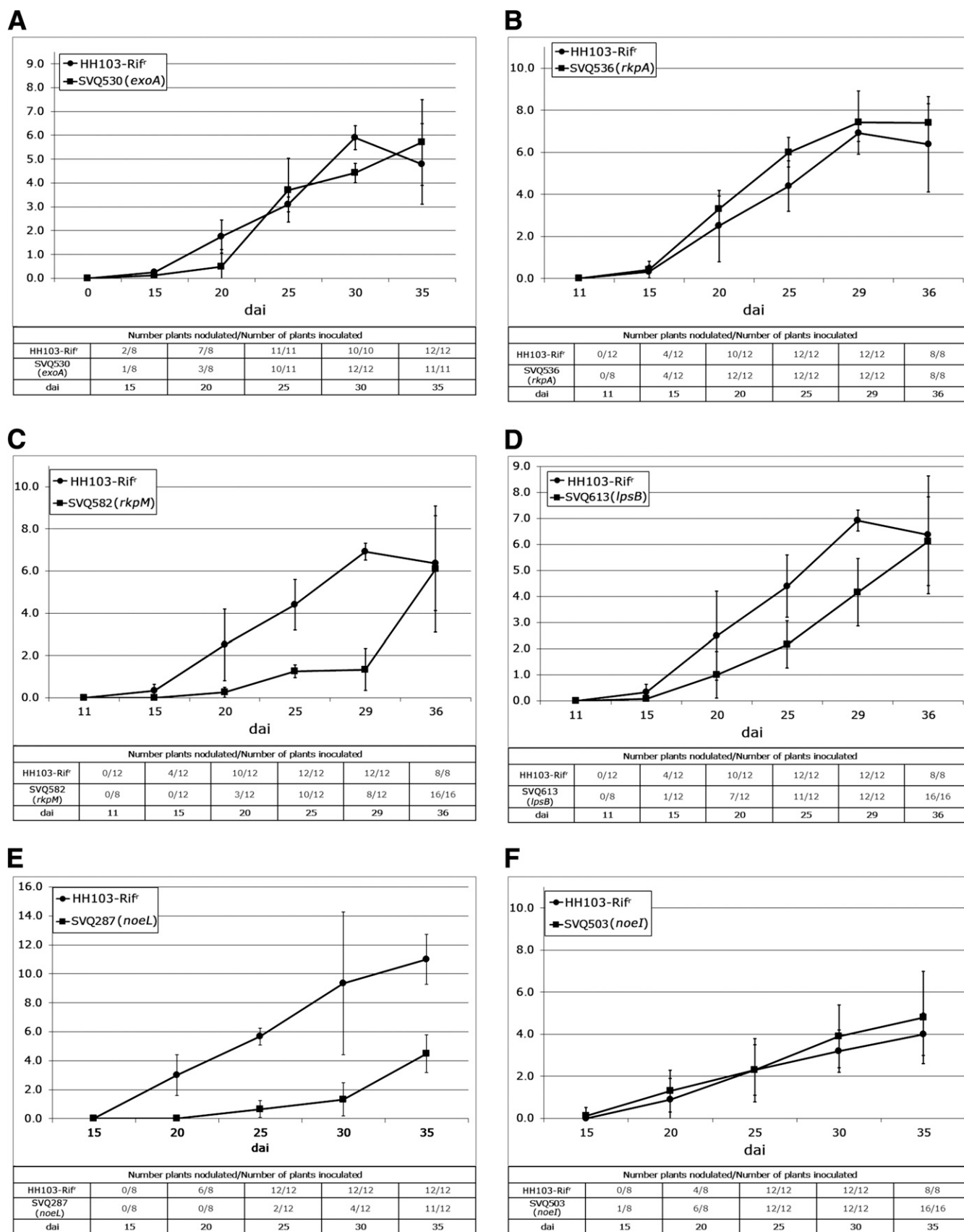


Fig. 2. Nodulation kinetics of *Lotus burtii* inoculated with *Sinorhizobium fredii* HH103-Rif^r and diverse mutants affected in surface polysaccharides or Nod factors. A, SVQ530 (*exoA*); B, SVQ536 (*rkpA*); C, SVQ582 (*rkpM*); D, SVQ613 (*lpsB*); E, SVQ287 (*noeL*); and F, SVQ503 (*noeI*). Eight to 16 plants were analyzed for determining nodule number per plant at each point of the time course experiments.

profile similar to that of SVQ582, were also significantly ($\alpha = 5\%$) impaired to nodulate *L. burtii*.

Neither the *rkpU* mutant (SVQ575, *rkp-1* region) nor mutants affected in the *rkp-3* region (*rkpM* and *rkpQ* mutants) induced the formation of nitrogen-fixing nodules on *L. japonicus* Gifu roots, although MRO were observed (Table 1). Mutant SVQ667 (*rkpL*, *rkp-3* region) also showed an altered LPS electrophoretic profile and failed to nodulate *L. japonicus* Gifu.

Mutants affected in KPS and EPS.

Mutant SVQ535 neither produces KPS nor EPS due to mutations in *rkpH* (*rkp-1* region) and *exoA* (Parada et al. 2006). The LPS profile of SVQ535 is similar to that of HH103-Rif^r (Parada et al. 2006). Mutant SVQ535 formed nitrogen-fixing nodules with *L. burtii* and nodulation (30.2 ± 12 nodules per plant) and plant development at 59 dai (13.6 ± 2.4 cm) were similar to those of plants inoculated with HH103-Rif^r (22.2 ± 3.2 nodules per plant and 14.5 ± 1.0 cm). *L. japonicus* Gifu plants inoculated with SVQ535 only formed ineffective root outgrowths.

LPS mutants.

S. fredii lpsB and *lpsE* are two contiguous genes that transcribe in opposite directions (Fig. 1C). The electrophoretic profiles of mutants SVQ613 (*lpsB*) and SVQ642 (*lpsE*) are altered in comparison with that of HH103-Rif^r (Margaret et al. 2013). Both mutants formed nitrogen-fixing nodules with *L. burtii* (Table 1). Further studies were carried out with the *lpsB* mutant. The kinetics of nodulation of SVQ613 was delayed in comparison with that shown by plants inoculated with HH103-Rif^r (Fig. 2D). Shoots developed by plants inoculated with SVQ613 were shorter (9.2 ± 1.8 cm) than those inoculated with HH103-Rif^r (14.5 ± 1.0 cm). In an independent nodulation test, shoot fresh weight of *L. burtii* plants inoculated with SVQ613 were 79% of that scored with the HH103-Rif^r inoculant, at 64 dai. Neither SVQ613 nor SVQ642 formed nitrogen-fixing nodules with *L. japonicus* Gifu plants, but MRO were observed.

CG mutants.

S. fredii SVQ562 is a HH103-Rif^r *cgs* (also called *ndvB*) mutant derivative unable to produce CG (Fig. 1D). It overproduces EPS and only forms ineffective nodules on soybean plants (Crespo-Rivas et al. 2009). As expected, both *L. burtii* and *L. japonicus* Gifu plants inoculated with SVQ562 only formed MRO and ineffective nodules from which bacteria were not isolated (Table 1).

Mutants affected in Nod factors.

We have investigated whether the symbiotic interaction between *S. fredii* HH103-Rif^r and *L. burtii* requires the presence of *S. fredii* HH103-Rif^r Nod factors. The symbiotic importance

of the fucosyl residue with or without one or both methyl or acetyl substitutions has also been investigated (Table 2). A *S. fredii* HH103-Rif^r *nodA* mutant (SVQ116) failed to nodulate *L. burtii*, which indicates that bacterial Nod factors are absolutely required in this symbiotic interaction.

Mutant SVQ287 (*noeL*) produces Nod factors that are devoid of the (methyl) fucosyl residue at position C-6 of the reducing end (Fig. 1E). *L. burtii* plants inoculated with SVQ287 showed reduced nodulation in comparison with those inoculated with *S. fredii* HH103-Rif^r at 48 dai (Table 2). Two other independent experiments showed similar results at 42 and 72 dai, since the number of nodules induced by SVQ287 (1.1 ± 0.2 and 8.3 ± 1.2 nodules per plant, respectively) was lower than that of plants inoculated with *S. fredii* HH103-Rif^r (7.0 ± 1.1 and 21.7 ± 2.1 nodules per plant, respectively). Plant-top fresh weight of plants inoculated with SVQ287 was similar to that of uninoculated plants at 48 dai (Table 2) but significantly higher at 72 dai. Kinetics of nodulation experiments showed that *L. burtii* roots inoculated with HH103-Rif^r were nodulated at 20 dai, while those inoculated with SVQ287 had not developed macroscopic nodules yet (Fig. 2E). Thus, nodulation and nitrogen fixation of SVQ287 with *L. burtii* is severely reduced.

Mutant SVQ503 carries a mutation in *noeI*, a gene coding for the transferase that methylates the fucosyl residue linked at the reducing end of the *N*-acetyl-glucosamine oligosaccharide (Fig. 1E). Nod factors produced by mutant SVQ503 were all devoid of the methyl substitution at the fucosyl residue, as it was previously reported (Madinabeitia et al. 2002). SVQ503 effectively nodulated *L. burtii* and the number of pink nodules formed at 48 dai was similar to that found in plants inoculated with *S. fredii* HH103-Rif^r (Table 2). Moreover, nodulation kinetics experiments did not reveal significant differences between plants inoculated with HH103-Rif^r or SVQ503 (Fig. 2F).

S. fredii HH103-Rif^r produces methylated Nod factors (Gil-Serrano et al. 1997), while those produced by *M. loti* R7A are acetylated (Rodpothong et al. 2009). To investigate whether the production of *S. fredii* HH103-Rif^r Nod factors containing acetylated fucosyl residues enhances nodulation on *L. burtii* roots, the *noeL* gene of *M. loti* R7A was polymerase chain reaction (PCR)-amplified and was cloned into plasmid pBBR1MCS5, generating plasmid pMUS1334. Plasmid pMUS1334 was transferred by conjugation to *S. fredii* HH103-Rif^r and SVQ503. Mass spectrometry analyses of HH103-Rif^r pMUS1334 cultures grown in the presence of genistein detected the presence of a mixture of Nod factors only carrying methylfucose, only acetyl fucose, and acetylmethylfucose (Supplementary Table S3). Nod factors produced by SVQ503 pMUS1334 cultures mainly contained non-substituted or acetylated fucosyl residues. Unexpectedly, a methylated Nod factor (IV [C_{18:1}, MeFuc]) was also detected. Nodulation tests on *L. burtii* plants showed that, at 48 dai, the presence of the *M. loti* R7A *noeL* gene in HH103-

Table 2. *Lotus burtii* responses to inoculation with *Sinorhizobium fredii* HH103-Rif^r and mutants SVQ287 (*noeL*) and SVQ503 (*noeI*)^z

Bacterial strain	Genetic characteristics	Symbiotic properties with <i>L. burtii</i>	
		Number of nodules/plant	Plant-top fresh weight (mg)
HH103-Rif ^r	Wild type	8.0 \pm 0.8 a	47.6 \pm 9.0 a
HH103-Rif ^r pMUS1334	Wild type carrying the <i>M. loti</i> R7A <i>noeL</i> gene	7.9 \pm 0.6 a	46.5 \pm 10.6 a
SVQ503	HH103-Rif ^r <i>noeI</i> :: Ω	9.4 \pm 1.0 a	69.3 \pm 16.8 a
SVQ503 pMUS1334	HH103-Rif ^r <i>noeI</i> :: Ω carrying the <i>M. loti</i> R7A <i>noeL</i> gene	9.6 \pm 0.4 a	57.9 \pm 6.6 a
SVQ287	HH103-1 <i>noeL</i> ::Tn5-B20	0.9 \pm 0.2 b	11.2 \pm 1.4 b
Uninoculated		0.0	13.5 \pm 1.8 b
LSD ($P = 0.05$)		2.0	28.8

^z Three jars containing four plants were tested per inoculant. Plants were analyzed at 48 days after inoculation. Mean numbers followed by the same letter in the same column are not significantly different ($P = 0.05$), using the least significant difference (LSD) test. Isolates from nodules showed the expected antibiotic resistant markers.

Rif^r and SVQ503 neither significantly increased the number of nodules nor plant-top fresh weight (Table 2).

Microscopic analyses of *L. burtii* roots inoculated with *S. fredii* HH103-Rif^r.

Previous reports have shown that rhizobial EPS, KPS, or an intact LPS are often necessary for the formation of effective nodules in at least one particular rhizobia-legume interaction (Krol and Becker 2009). Since the symbiotic impairment of *S. fredii* HH103-Rif^r KPS and LPS mutants is more severe with *Glycine max* (soybean) than with *L. burtii* (Table 1), we have investigated how *S. fredii* HH103-Rif^r infects *L. burtii* roots. Light microscopic and confocal microscopic analyses of *L. burtii* roots inoculated with *S. fredii* HH103-Rif^r carrying the pFAJDsRed plasmid (Kelly et al. 2013) were carried out. At 2 to 3 weeks postinoculation, *S. fredii* HH103-Rif^r was found in microcolonies of curled root hairs and ITs were only very rarely initiated (Fig. 3 A and B) and none progressed further. The number of ITs in *L. burtii* and *L. japonicus* Gifu inoculated

with *S. fredii* HH103-Rif^r was counted and was practically null (Fig. 4). In contrast, *M. loti* MAFF303099 DsRed strain (Maekawa et al. 2009) invaded *L. burtii* roots by the formation of root hair ITs (Figs. 3J and K and 4). In vibratome sections of root nodules, we could observe infection pockets associated with crack entry in the nodules (Fig. 3D and E). Additionally, *S. fredii* HH103-Rif^r was detected between cells in the nodule (Fig. 3E and G). Therefore, the successful infection of *L. burtii* roots by *S. fredii* HH103-Rif^r occurs by crack entry rather than via root hair ITs (Figs. 3H to K and 4).

Purine and pyrimidine auxotrophic mutants.

Previous reports have shown that purine- and pyrimidine-auxotrophic rhizobial mutants are not only impaired for infecting legumes through root-hair ITs (Buendía-Clavería et al. 2003; Crespo-Rivas et al. 2007; Noel et al. 1988) but, also, for the infection of legumes through cracks in the root epidermis (Giraud et al. 2007). Therefore, we have investigated a *S. fredii* HH103-Rif^r auxotrophic mutant (SVQ295, mutated in

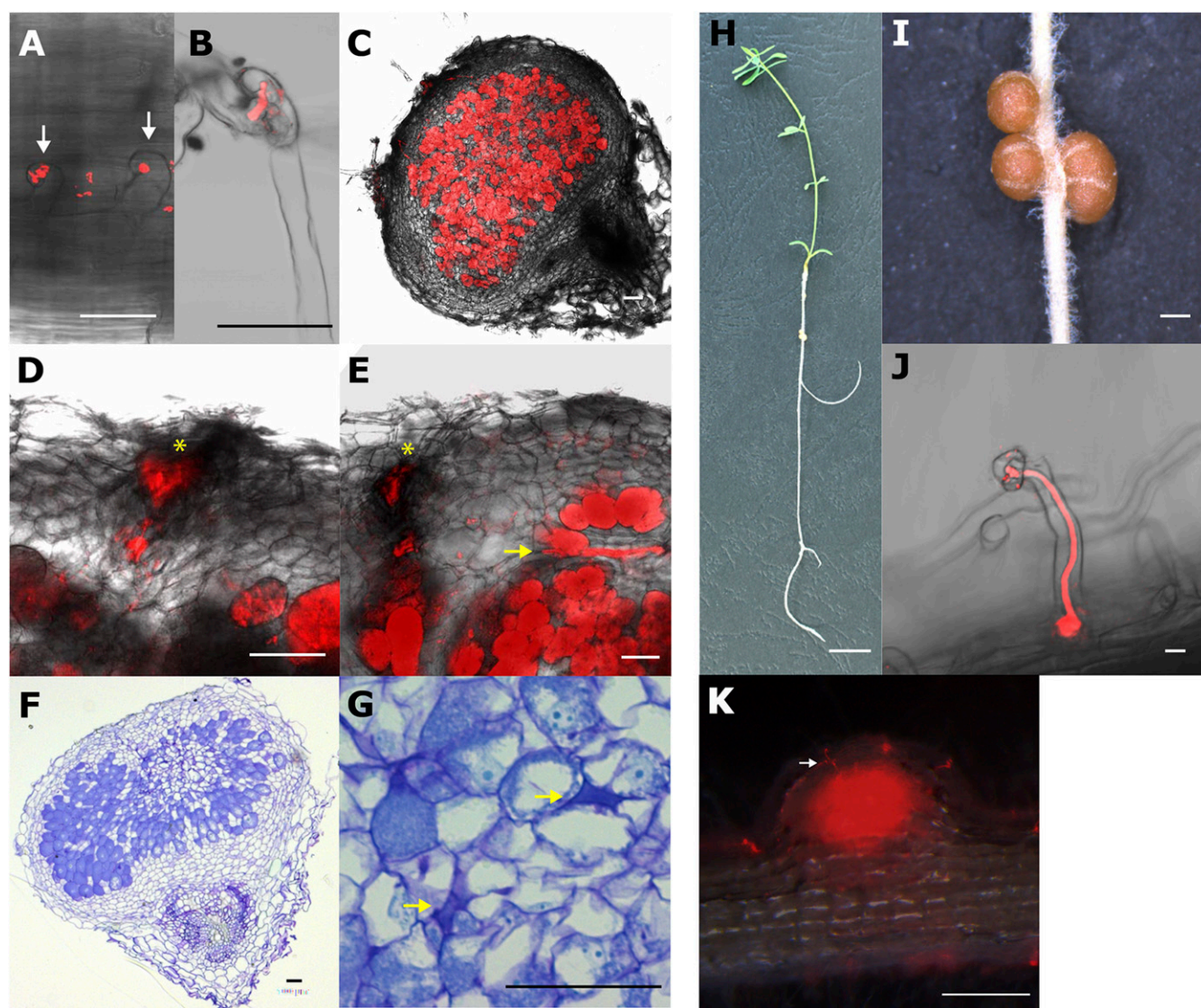


Fig. 3. The symbiotic phenotype of *Lotus burtii* inoculated with *Sinorhizobium fredii* HH103-Rif^r and *Mesorhizobium loti* MAFF303099. **A**, *S. fredii* HH103-Rif^r DsRed colonies in curled root hairs at 2 weeks postinoculation (wpi) and **B**, in early infection threads (IT) at 3 wpi. **C** to **G**, Sections of *L. burtii* nodules at 2 to 4 wpi with *S. fredii* HH103-Rif^r DsRed. White arrows show microcolonies of *S. fredii* HH103-Rif^r. Yellow stars show the place for crack entry. Yellow arrows show bacteria that colonize between the cells in the nodule. Bars in **A** to **G** are 50 μm. **H** to **K**, *L. burtii* plants at 3 wpi with *M. loti* MAFF303099 DsRed. **H**, *L. burtii* whole plant, **I**, nodules, **J**, IT, and **K**, IT elongated from the root hair to the nodule of *L. burtii* inoculated with *M. loti* MAFF303099 DsRed at 9 days after inoculation. Scale bars are 1 cm in **H**, 1 mm in **I**, 10 μm in **J**, and 500 μm in **K**.

purL) that requires the exogenous addition of adenine and thiamine for their capacity to nodulate *L. burtii* plants. Sixteen *L. burtii* plants inoculated with SVQ295 failed to nodulate at 49 dai. We also tested whether SVQ295, which produces Nod factors (Buendía-Clavería et al. 2003), could capacitate mutant SVQ116 (*nodA*) for nodulating *L. burtii* roots in coinoculation experiments. None of the 22 *L. burtii* plants coinoculated with SVQ295 and SVQ116 formed nodules at 49 dai. SVQ295 also failed to nodulate *L. burtii* plants grown for 35 days in petri dishes containing agar-solidified plant nutrient solution supplemented with adenine (12 µg/ml) and thiamine (0.8 µg/ml). Neither the presence of adenine or adenine and thiamine together appeared to cause any negative impact on uninoculated roots.

Mutant SVQ292 is a *S. fredii* HH103-Rif^r pyrimidine auxotrophic mutant (mutated in *pyrF*) that requires the addition of uracil. *L. burtii* plants inoculated with SVQ292 only formed ineffective nodules in which nitrogenase activity was not detected by acetylene-reduction assays. The presence of uracil (12 µg/ml) in the plant nutritive solution did not alleviate the symbiotic impairment of SVQ292 with *L. burtii*, in petri-dish nodulation assays.

Bacterial flagella are not required for crack infection.

To investigate whether flagella-dependent mobility was required by *S. fredii* HH103-Rif^r to invade *L. burtii* roots through cracks, we constructed a *S. fredii* HH103-Rif^r mutant (SVQ705) devoid of flagella by deletion of the *flaCBAD* genes (discussed below). Mutant SVQ705 did not show any swimming mobility in Bromfield's semisolid media (Supplementary Fig. S5). Nodulation assays revealed that *L. burtii* plants inoculated with SVQ705 formed nitrogen-fixing nodules.

DISCUSSION

L. burtii and the model legume *L. japonicus* are mainly nodulated by rhizobial strains classified as *Mesorhizobium loti*. *S. fredii* HH103-Rif^r nodulates *L. burtii* and, also, a broad range of herbaceous, shrub, and tree legumes (Margaret et al. 2011; Sandal et al. 2012). Some of them form determinate nodules, while others induce the formation of indeterminate nodules. Because of this broad symbiotic capacity, *S. fredii*

HH103-Rif^r can be used in studies aimed at determining which bacterial structures or chemical signals or combination thereof are specifically relevant for the symbiosis with a particular legume.

We have investigated the symbiotic properties of *S. fredii* HH103-Rif^r mutants affected in the biosynthesis of surface polysaccharides and Nod factors with *L. burtii* and *L. japonicus*. The studies on *L. burtii* were aimed at determining which particular *S. fredii* HH103-Rif^r surface polysaccharide and which Nod factor structure or structures are important or even indispensable for a successful *L. burtii*-*S. fredii* HH103-Rif^r symbiosis. In contrast, studies on *L. japonicus* Gifu were carried out to investigate whether elimination or alteration of any particular surface polysaccharide or Nod factor structure enabled *S. fredii* HH103-Rif^r to nodulate this legume. All *S. fredii* HH103-Rif^r surface polysaccharide mutants tested here have been previously investigated for their symbiotic capacity with *Glycine max* (López-Baena et al. 2016) so that the comparisons with their symbiotic phenotype with *L. burtii* can be established.

Mutant SVQ530 (*exoA*) does not produce EPS and is not impaired in nodulation of soybeans (Parada et al. 2006). Instead, SVQ530 shows enhanced competitiveness for soybean nodulation (Rodríguez-Navarro et al. 2014). *S. fredii* HH103-Rif^r and SVQ530 appear to have the same symbiotic capability with *L. burtii*, which indicates that EPS might not play any significant role in this symbiotic interaction. However, a recent report has shown that *L. japonicus* possesses a receptor-like kinase that binds to *M. loti* R7A EPS. This receptor, EPR3, distinguishes symbiotically compatible EPS forms from those that determine symbiotic incompatibility (Kawaharada et al. 2015). Truncated *M. loti* R7A EPS forms impaired nodulation with *L. japonicus*, while an R7A *exoA* mutant, unable to produce EPS, formed nitrogen-fixing nodules (Kelly et al. 2013). The *S. fredii* HH103-EPS is composed of glucose, galactose, and glucuronic acid (Rodríguez-Navarro et al. 2014), while that of *M. loti* R7A also contains riburonic acid (Kelly et al. 2013; Muszyński et al. 2016). *L. japonicus* EPR3 might recognize the *S. fredii* HH103-EPS as nonsymbiotic, resulting in the formation of noninfected nodules. However, a hypothetical EPS-mediated incompatibility would not entirely account for the symbiotic incompatibility between *S. fredii* HH103-Rif^r and *L. japonicus*, because SVQ530 does not produce EPS and has not gained nodulation capacity with this legume.

Two KPS mutants affected in the *rkp-1* region (SVQ536 and SVQ575) did not show any significant symbiotic impairment with *L. burtii*. *rkpA* belongs to an operon of five genes (*rkpA*, *rkpG*, *rkpH*, *rkpI*, and *rkpJ*) that are contiguous and transcribe in the opposite direction of *rkpU* (Fig. 1A). The *rkpA* gene encodes a putative 2-amino-3-ketobutyrateCoA-ligase, while *rkpU* codes for a protein related to the export of capsular polysaccharides (Hidalgo et al. 2010; Margaret-Oliver et al. 2012). SVQ536 does not show any appreciable alteration in its LPS electrophoretic profile (Margaret-Oliver et al. 2012). Thus, the absence of only KPS in SVQ536 does not provoke any severe symbiotic impairment with this legume.

Mutant SVQ575 shows slight variations in the LPS profile but only when bacterial cultures become 5 days old (Hidalgo et al. 2010), which corresponds to the late stationary phase. No detectable SVQ575 LPS alterations are visualized in the early stationary phase (Hidalgo et al. 2010), which is the normal age (2 to 3 days) of the *S. fredii* HH103-Rif^r inoculum used in nodulation tests. All these results suggest that the LPS profile alterations shown by SVQ575 are not relevant for the symbiotic interaction between *S. fredii* HH103-Rif^r and *L. burtii* or that they are not present in the 2- to 3-day-old bacterial inoculant. In summary, *S. fredii* HH103-Rif^r mutants in the *rkp-1* region are symbiotically impaired with soybeans (Hidalgo et al. 2010;

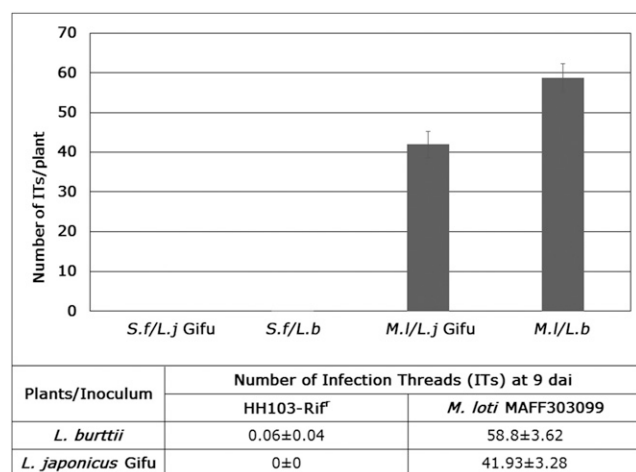


Fig. 4. Number of root hair infection threads (ITs) of *Lotus japonicus* Gifu and *L. burtii* 9 days after inoculation with *Sinorhizobium fredii* HH103-Rif^r DsRed (columns 1 and 2, respectively) or *Mesorhizobium loti* MAFF303099 DsRed (columns 3 and 4, respectively). The number of *L. japonicus* Gifu and *L. burtii* plants inoculated with *S. fredii* HH103-Rif^r DsRed was 50 and 54. Fifteen *L. japonicus* Gifu and *L. burtii* plants were inoculated with *M. loti* MAFF303099 DsRed.

Margaret et al. 2012; Parada et al. 2006) but not with *L. burtii* (Table 1).

In contrast, mutant SVQ582 (affected in the *rkp-3* region, unable to produce KPS) showed reduced nodulation with *L. burtii* (Table 1) and its kinetics of nodulation was delayed in comparison with its parental strain (Fig. 2C). The LPS electrophoretic pattern of *S. fredii* SVQ582 is clearly altered in comparison with that of HH103-Rif^r (Margaret et al. 2012), and these alterations are different to that exhibited by SVQ575. In comparison with their respective HH103-Rif^r control, SVQ582 LPS silver-stained bands migrate faster than those of SVQ575. Thus, the differential symbiotic capacity of *rkp-1* mutants and SVQ582 with *L. burtii* could be due to the specific LPS structural alterations shown by SVQ582. The *S. fredii* HH103-Rif^r *rkpM* mutation appears more deleterious for the bacterial symbiotic capacity with soybean than with *L. burtii*, since only the latter can form nitrogen-fixing nodules. None of the tested KPS mutants belonging to the *rpk-1* region (*rpkA* and *rkpU*) or *rkp-3* region (*rkpM* and two other mutants affected in *rkpL* and *rkpQ*) has gained nodulation capacity with *L. japonicus* Gifu, which indicates that the presence of KPS might not be responsible for the absence of effective nodules on *L. japonicus* roots inoculated with *S. fredii* HH103-Rif^r.

KPS can replace EPS for a successful nodulation of *S. meliloti* with *Medicago sativa* (Pellock et al. 2000). Due to this symbiotic equivalence, *S. meliloti* mutants that only produce EPS or KPS are still symbiotically effective. In the soybean–*S. fredii* HH103-Rif^r symbiosis, mutant SVQ536 (EPS⁺ KPS[−]) is impaired, while mutant SVQ530 (EPS[−] KPS⁺) is not negatively affected (Parada et al. 2006). The *S. fredii* mutant (SVQ535) unable to produce EPS and KPS was still able to form nitrogen-fixing nodules with *L. burtii* and failed to nodulate *L. japonicus* Gifu. Hence, the simultaneous absence of EPS and KPS production neither abolishes nodulation with *L. burtii* nor enhances nodule formation on *L. japonicus* roots.

Mutations affecting rhizobial LPS usually cause severe negative impacts on symbiosis forming determinate nodules, such as those constituted by *S. fredii*–soybean (Margaret et al. 2013), *Bradyrhizobium* spp.–soybean (Stacey et al. 1991), or *Rhizobium etli*–*Phaseolus vulgaris* (Noel et al. 1986). Although the LPS electrophoretic profiles of *S. fredii* mutants SVQ613 (*lpsB*) and SVQ642 (*lpsE*) are clearly altered due to mutations in genes involved in LPS synthesis (Fig. 1) (Margaret et al. 2013), only the former showed moderate symbiotic impairment with *L. burtii* (Table 1). The negative impact caused by the *lpsB* mutation on the *S. fredii* HH103-Rif^r symbiotic capacity is much stronger in soybean than in *L. burtii*, suggesting that the requirement of an intact HH103-Rif^r LPS structure might be more important in soybean and *P. vulgaris* than in the *Lotus* sp. This absence of severe symbiotic impairments associated to LPS mutations is in line with previous results showing that a *M. loti* mutant totally devoid of O-antigen was still able to induce nitrogen-fixing nodules on *L. tenuis* (D'Antuono et al. 2005). Further studies including more *Lotus* spp. should be carried out to elucidate this question.

L. burtii plants inoculated with mutant SVQ562 (*ndvB*) formed ineffective nodules, which is the same symbiotic phenotype previously observed with soybean (Crespo-Rivas et al. 2009). This result is also in line to those previously reported for a diversity of rhizobial mutants unable to produce CG (Breedveld and Miller 1998). To our knowledge, the symbiotic capacity of all the *ndvB* mutants (such as *S. meliloti*, *S. fredii*, *M. loti*, or *B. japonicum*) investigated fail in the formation of nitrogen-fixing nodules with their respective host legumes (Crespo-Rivas et al. 2009; D'Antuono et al. 2005; Dylan et al. 1986).

Nodulation factors produced by *S. fredii* HH103-Rif^r and *M. loti* R7A share some structural characteristics, such as the

presence of C16 and C18 saturated or mono-unsaturated acyl groups at the nonreducing terminal *N*-acetyl-glucosamine residue and the presence of fucosyl decorations linked to the terminal reducing end. Examples of structural differences are the presence of carbamoyl substitutions only in *M. loti* R7A and that the fucosyl residue has 2-*O*-methyl substitutions in *S. fredii* HH103-Rif^r but 4-*O*-acetyl (or 3-*O*-acetyl) decorations in *M. loti* R7A (Bek et al. 2010; Gil-Serrano et al. 1997; López-Lara et al. 1995). *S. fredii* SVQ287 is a *noeL* mutant that produces Nod factor devoid of fucosyl residues (Lamrabet et al. 1999). Now, we have identified new Nod factors bearing saturated C₁₀, C₁₂, and C₁₄ acyl chains as well as a Nod factor carrying an *N*-methylation at the nonreducing *N*-acetyl-glucosamine (IV [C_{14:0}, NMe]). Nod factor bearing C₁₂, and C₁₄ fatty acids have previously been reported in *M. loti* (Rodpothong et al. 2009) and Nod factors carrying C₁₀ acyl chains in *Rhizobium tropici* (Morón et al. 2005).

SVQ287 is outcompeted by its wild-type HH103-1 to nodulate soybean cv. Williams (Lamrabet et al. 1999). The reduction in the number of nodules formed with *L. burtii* (89 and 84% in two independent experiments) was similar to that (80%) previously reported in soybean cv. Williams (Lamrabet et al. 1999). Mutant SVQ287 shows delayed nodulation with both *L. burtii* and soybean, although this delay appears more pronounced with the former. Previous reports have shown that a *M. loti* R7A *nodZ* mutant has a host-specific phenotype: normal effective nodulation with *L. burtii*, delayed effective nodulation with *L. japonicus* Gifu and the formation of uninfected nodules on *L. filicaulis* and *L. corniculatus* (Rodpothong et al. 2009). Pacios-Bras and associates (2000) demonstrated that a *Rhizobium leguminosarum* strain showing constitutive (flavonoid-independent) transcription of *nod* genes and also carrying the *M. loti* *nodZ* and *noeL* genes has gained the capacity to nodulate *L. japonicus* but not *L. filicaulis*. This host-specific phenomenon was due to differences in the *Nfr5* receptor genes of *L. japonicus* and *L. filicaulis* (Radutoiu et al. 2007). Thus, the symbiotic impairment caused by the absence of fucosyl residues is very evident in the symbiosis *L. burtii*–*S. fredii* HH103-1 but negligible in the symbiosis *L. burtii*–*M. loti* R7A. Whether the differential symbiotic impact caused by the absence of the fucosyl residue is related to the fact that *S. fredii* HH103-Rif^r infects *L. burtii* roots through cracks while *M. loti* N2P2235 invades through ITs remains to be elucidated.

S. fredii SVQ503 is a *noeL* mutant devoid of the symbiotic methyl transferase that adds methyl substituents to the fucosyl residue (Fig. 1E). Mass spectrometry analysis showed that Nod factors produced by SVQ503 do not carry methyl substituents in the fucosyl residue, as we previously reported (Madinabeitia et al. 2002). No significant differences were found between the number of nodules, plant-top fresh weight, and kinetics of nodulation of *L. burtii* plants inoculated with HH103-Rif^r or SVQ503 (Table 2; Fig. 2F). Thus the presence of a methyl substitution in the fucosyl residue does not apparently play any significant role in the *L. burtii*–*S. fredii* HH103-Rif^r symbiotic interaction. In the *L. burtii*–*M. loti* R7A symbiosis, however, the absence of the acetyl substitution in the fucosyl residue causes a delay in nodule formation (Rodpothong et al. 2009).

Because *S. fredii* HH103-Rif^r Nod factors do not contain acetyl-fucosyl residues, we have transferred the *M. loti* R7A *nolL* gene (cloned in plasmid pMUS1334) to *S. fredii* HH103-Rif^r and to its *noeL* mutant derivative SVQ503. The production of Nod factors carrying acetyl substituents in the fucosyl residue did not significantly improve bacterial capacity to nodulate *L. burtii* (Table 2), regardless whether the methyl substitution is also present (as in HH103-Rif^r pMUS1334) or absent (as in SVQ503 pMUS1334). In conclusion, the loss of the fucosyl residue is very damaging for the *S. fredii* HH103 symbiotic capacity with *L. burtii*, while the presence or absence of one or

more methyl and acetyl substitutions does not cause a significant impact.

A single Nod factor carrying methylfucose (IV [C_{18:1}, MeFuc]), which might originate from the activity of an un-specific methyl transferase that can functionally complement the NoeI enzyme was unexpectedly present in *S. fredii* SVQ503 pMUS1334 cultures. It was not detected in previous works (Madinabeitia et al. 2002). This finding is in line with previous reports showing that a *M. loti* R7A *nolL* mutant still produces some acetylated Nod factors, probably due to the activity of other acetyltransferases (Rodpothong et al. 2009).

None of the *S. fredii* HH103-Rif^r surface polysaccharide and Nod factor mutants investigated has gained nodulation capacity with *L. japonicus*. This fact does not exclude that HH103-Rif^r surface polysaccharides could act as incompatible signals for *L. japonicus*, because it is still possible that more than one HH103-Rif^r surface polysaccharide is blocking the nodulation process. Should it be the case, *S. fredii* HH103-Rif^r mutants unable to produce a single particular wild-type surface polysaccharide would still be blocked by the presence of another incompatible surface polysaccharide. The double EPS⁻ KPS⁻ mutant (SVQ535) has not gained nodulation capacity with *L. japonicus*, revealing that these two surface polysaccharides are not cooperating to block nodulation. The loss of CG production leads to the loss of effective nodulation in *L. burtii* and does not cause any symbiotic improvement with *L. japonicus*. Thus, if two different HH103-Rif^r surface polysaccharides were responsible for the failure to nodulate *L. japonicus*, LPS might be one of the candidates.

Up to now, three different rhizobial entry modes have been described in the different legumes investigated: intercellular single infection, crack entry, and IT invasion (Sprenst 2007). Intercellular single infection is suggested to be the most primitive way by which rhizobia invade legume roots, followed by the crack entry and root hair–infection modes (Madsen et al. 2010). Our confocal microscopy studies, together with the inability of the HH103-Rif^r *nodA* mutant to nodulate *L. burtii*, demonstrate that the way *S. fredii* HH103-Rif^r invades *L. burtii* roots can be classified in the intermediate-evolutionary stage, i.e., Nod factor–dependent crack entry mode. At least in the *L. burtii*–*S. fredii* HH103-Rif^r symbiosis, this mode of infection does not strictly require the production of surface polysaccharides released by the bacteria (such as EPS) or linked to the external leaflet of the outer membrane (such as KPS). Neither does it require the wild-type HH103-Rif^r LPS forms, since none of the different LPS alterations shown by mutants SVQ613 (*lpsB*), SVQ642 (*lpsE*), SVQ575 (*rkpU*), and SVQ582 (*rkpM*) have totally abolished nodule formation in *L. burtii* roots (Table 1). Mutant SVQ562 was the only *S. fredii* HH103-Rif^r surface polysaccharide mutant that failed to form nitrogen-fixing nodules with *L. burtii*. Occasionally, *L. burtii* roots inoculated with SVQ562 formed nitrogen-fixing nodules, but isolates from these nodules did not carry the *ndvB* mutation. Thus, CG are not only necessary for invasion through ITs, such as in the *S. fredii* HH103-Rif^r–soybean or *S. meliloti*–alfalfa symbioses but, also, in the less-evolved *L. burtii*–*S. fredii* HH103-Rif^r crack-entry mode.

A *S. fredii* HH103-Rif^r *purL* mutant (SVQ295) also failed to nodulate *L. burtii*, indicating that the purine metabolic pathway is important for this symbiotic interaction. Coinoculation of soybean roots with SVQ295 (auxotrophic for adenine and thiamine but producing Nod factor) and SVQ116 (prototrophic but unable to produce Nod factors) results in the formation of nitrogen-fixing nodules on soybean roots in which only SVQ116 is detected inside the nodules (Buendía-Clavería et al. 2003). Physiological complementation has also been observed in coinoculation experiments in which *S. meliloti* Nod⁻ mutants are complemented by Exo⁻ mutants, resulting in the formation

of nitrogen-fixing nodules on alfalfa roots (Müller et al. 1988). In contrast, the pair of *S. fredii* SVQ295 and SVQ116 coinoculants does not induce effective nodules on *L. burtii* roots, which suggest that plant requirements of bacterial signals (quantity and, possibly, localization) are not the same in the symbioses mentioned above. Elucidating whether the different modes of root infection, through root hair ITs (soybean–*S. fredii* HH103-Rif^r) or through cracks (*L. burtii*–*S. fredii* HH103-Rif^r), actually accounts for the different results observed in coinoculation experiments remains to be investigated.

L. burtii roots are infected by *M. loti* through root-hair ITs, while *S. fredii* HH103-Rif^r invades this legume through epidermal cracks (Fig. 3). Similarly, *L. japonicus* Nepal can switch from intercellular bacterial entry with *Rhizobium leguminosarum* Norway to root-hair IT infection with *M. loti* (Gossmann et al. 2012). All these results clearly indicate that the roots of a particular legume that can be infected by different rhizobia might be invaded by different modes of infection.

MATERIALS AND METHODS

Molecular and microbiological techniques.

Bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Supplementary Table S4. *S. fredii* strains were grown at 28°C on tryptone yeast (TY) medium (Beringer 1974) or yeast mannitol medium (Vincent 1970). *Escherichia coli* was cultured on Luria-Bertani medium (Sambrook et al. 1989). When required, the media were supplemented with antibiotics (concentrations in micrograms per milliliter): rifampicin, 25; streptomycin, 400; kanamycin, 50 (25 for *E. coli*); neomycin, 100; tetracycline, 4 (10 for *E. coli*); gentamycin, 5 (10 for *E. coli*); and spectinomycin, 100. Plasmids were transferred from *E. coli* to rhizobia by conjugation, as described by Simon (1984), with plasmid pRK2013 as helper. Recombinant DNA techniques were performed according to the general protocols of Sambrook and associates (1989). PCR amplifications were performed as previously described (Vinardell et al. 2004). The sets of DNA primers used in this work are listed in Supplementary Table S5. LPS extraction from bacterial cultures grown on solid TY medium, separation on sodium dodecyl sulfate PAGE gels, and silver staining were performed as described previously (Buendía-Clavería et al. 2003).

Cloning of the *M. loti* R7A *nolL* gene.

A 1.5-kb fragment containing the *nolL* gene was PCR-amplified using primers MlnolLEco-F and MlnolLBam-R and *M. loti* R7A genomic DNA as template. The 1.5-kb amplified fragment was digested with *EcoRI* and *BamHI* and was subcloned into plasmid pBBR1MCS-5, generating plasmid pMUS1334. Plasmid pMUS1334 was transferred to HH103-Rif^r and SVQ503 by triparental conjugations, using pRK2013 as a helper.

Construction of a *S. fredii* HH103-Rif^r mutant carrying a deletion of the *flaC*, *flaB*, *flaA*, and *flaD* genes.

An in-frame *flaC*, *flaB*, *flaA*, and *flaD* gene deletion (4,438 bp) was constructed by the overlap extension PCR technique (Griffitts and Long 2008), using the pairs of primers *flaA/flaB* and *flaC/flaD*. The resulting fragment (1,401 bp) was digested with *HindIII* and *BamHI* and was subcloned into pK18mobsac, generating plasmid pMUS1141. The homogenization was carried out by triparental conjugation, using pRK2013 as a helper plasmid. A rifampicin- and sucrose-resistant (12.5% wt/vol) HH103-Rif^r transconjugant, called SVQ705, was investigated for the absence of the *flaC*, *flaB*, *flaA*, and *flaD* genes by PCR assays using the *flaA/flaD* primers. Swimming assays were carried out to investigate the flagella-dependent motility capacity of SVQ705. Petri plates

containing Bromfield's medium solidified with 0.24% (wt/vol) agar were inoculated with 3- μ l aliquots of rhizobial cultures grown in TY until early stationary phase (optical density at 600 nm = 1.0). Bacterial mobility was scored 4 days after inoculation.

Identification of lipo-chitoligosaccharides (LCOs).

Purification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (MS/MS) analyses of LCOs produced by *Sinorhizobium fredii* HH103-Rif^r and its *noeI* (SVQ503) mutant carrying the *M. loti* R7A *nolL* gene grown in B minimal medium (van Brussel et al. 1977) supplemented with 3.6 μ M genistein were performed as described previously (Crespo-Rivas et al. 2009). Briefly, the samples were redissolved in 1 ml of 50% acetonitrile/water (vol/vol) and 50- μ l aliquots were injected onto the high-pressure liquid chromatography (HPLC)-electrospray ionization-MS/MS system. Chromatographic separation was performed using a PerkinElmer Series 200 HPLC system (Wellesley, MA, U.S.A.) coupled to an Applied Biosystems QTRAP LC/MS/MS system (Foster City, CA, U.S.A.) consisting of a hybrid triple quadrupole linear ion trap (QqQlit) mass spectrometer equipped with an electrospray ion source. HPLC analyses were performed on a 200 \times 2.1 mm Tracer Excel 120 ODSB C18 reversed-phase column with a particle size of 5 mm (Teknokroma, Barcelona, Spain). Chromatographic separation was performed using a binary gradient consisting of (A) water and (B) acetonitrile, both components containing 0.1% formic acid (vol/vol). The elution profile was 30% B (30 min), linear up to 30% B (15 min), 100% B (2 min), linear up to 30% B (3 min), and isocratic for 5 min (30% B). The flow rate was 0.3 ml min⁻¹. The mass spectrometer was set to the following optimized tune parameters: curtain gas, 35 psi; ion spray voltage, 5,500 V; source temperature, 300°C; source gas, 20 psi; declustering potential, 70 V; and entrance potential, 10 V; and, for each MS/MS spectrum, the collision energy setting was 35 V. In MS mode, ions over the m/z range of 700 to 1,600 were registered. For MS/MS acquisition, the information data-dependent function was used, where each MS scan was followed by product ion acquisition of the two most abundant ions in the mass spectrum. Product ions of m/z 150 to 1,600 were recorded in MS/MS mode.

Plant tests.

Nodulation tests were carried out on *Lotus arenarius* Brot, *L. corniculatus* L. cv. Leo, *L. creticus* L., *L. cytisoides* L., *L. filicaulis* Durieu, *L. glaber* Mill., *L. krylovii* Schischkin & Serg., *L. japonicus* (Regel) K. Larsen ecotypes Gifu and Miyakojima MG-20, *L. burtii* Borsos and *L. uliginosus* Schkuhr (Degtjareva et al. 2008; Handberg and Stougaard 1992; Kawaguchi et al. 2001, 2005). *Lotus* seeds were surface-sterilized as previously described (Heckmann et al. 2011). Four germinated seeds were transferred to each Leonard jar assembly. Leonard jars were composed of an upper vessel containing 220 ml of sterilized vermiculite supplemented with Rigaud and Puppo's nutrient solution (Rigaud and Puppo 1975) and a lower recipient filled with 180 ml (pH 7.0) of the plant nutrient solution. Each Leonard jar was inoculated with at least 10⁸ bacteria. Inoculated *Lotus* plants were grown for 6 to 10 weeks in a greenhouse or in plant-growth chambers. The detection of nitrogenase activity in *Lotus* nodules was carried out by acetylene reduction assays as described previously for clovers (Buendía-Clavería et al. 1986). To identify bacteria occupying the nodules, *Lotus* nodules were surface-sterilized by immersing them in bleach (1/5 dilution of a stock solution containing 14% [wt/vol] sodium hypochlorite) for 2 min, followed by 5 washing steps in Vincent's mineral salt solution [VMS] [Vincent 1970]). The effectiveness of the surface-sterilizing treatment was checked by inoculating TY plates with 20- μ l aliquots of the last

washing step. Individual surface-sterilized nodules were crushed in 30 μ l of VMS and 20- μ l aliquots were used to inoculate TY plates. Bacterial isolates were tested on appropriately supplemented medium to determine whether they retained the antibiotic-resistance markers of the bacteria used to inoculate the plants. *L. burtii* nodulation tests were also carried out in square petri dishes containing the plant nutrient solution solidified with 10 g per liter of agar supplemented with adenine and thiamine at final concentrations of 12 and 0.8 μ g/ml, respectively.

Kinetics of nodulation experiments were carried out as follows: Leonard jars containing four *L. burtii* seedlings were inoculated with 1 ml of midlog phase bacterial cultures. Inoculated *L. burtii* plants with *S. fredii* HH103-Rif^r (positive control) or with mutants affected in surface polysaccharides or Nod factors were grown in a plant-growth chamber with a 16 h photoperiod at 25°C (light) and 18°C (darkness). Nodulation of 8 to 16 plants was scored at 15, 20, 25, 29 to 30, and 35 to 36 days after inoculation.

Competition experiments between *S. fredii* HH103-Rif^r and *M. loti* N2P2235 strains on *Lotus burtii* and the determination of nodule occupancy were carried out as follows: bacteria were grown to midlog phase and five Leonard jar assemblies containing four *L. burtii* seedlings were inoculated with 1 ml of a mixture of bacterial competitors in a 1:1 ratio. Plants were grown for 6 weeks under greenhouse conditions. To determine nodule occupancy, *L. burtii* nodules were surface-sterilized and were crushed on yeast mannitol agar media. Because *S. fredii* HH103-Rif^r and *M. loti* N2P2235 are both resistant to rifampicin, melanin production capacity and the aspect (color and mucosity) of bacterial colonies were used to determine nodule occupancy in competition experiments between these two strains. *S. fredii* HH103-Rif^r produces melanin while *M. loti* N2P2235 fails to produce the pigment, following the protocol for melanin detection previously described (Cubo et al. 1988).

Nodule sectioning.

Two- to six-week-old *L. burtii* nodules induced by *S. fredii* HH103-Rif^r DsRed strain were embedded in 3% agarose in water and were sliced in thick layer sections (50 to 100 μ m), using a Leica VT 1000S vibratome. Sections of nodule were observed using a Zeiss LSM510 META confocal microscope.

For semithin layer sections, nodules were fixed in a mixture of 4% (wt/vol) paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2. Samples were then embedded using a Technovit 7100 (Heraeus Kulzer), were sliced in semithin layer sections (7 μ m) using a Leica RM2045 microtome, and were then mounted onto microscope slides. Sections were stained with 0.1% toluidine blue in water and were observed using a Zeiss Axioplan 2 image microscope. For counting ITs, *L. burtii* and *L. japonicus* Gifu seedlings were inoculated with *S. fredii* HH103-Rif^r DsRed or *M. loti* MAFF303099 DsRed, 6 days after germination. Nine days after inoculation, the ITs were counted by Zeiss Axioplan 2 imaging and were observed using a Leica M165FC microscope.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by grants from the Andalusia government (P11-CVI-7500) and the Spanish Ministry of Science and Innovation (BIO2011-30229-C01). S. Acosta-Jurado is the recipient of a Ph.D. grant from the VPPI of University of Seville. We also thank M.-J. Soto for helping us in the construction of the HH103-Rif^r Δ *flaCBAD* derivative and J. M. Acebes for his contribution to the photographic panels. We also thank Centro de Investigación, Tecnología e Innovación (CITIUS) of the University of Seville for mass spectrometry facilities. Y. Kawaharada, H. Jin, S. U. Andersen, N. Sandal, and J. Stougaard are supported by the Danish National Research Foundation grant no. DNRF79.

LITERATURE CITED

- Bek, A. S., Sauer, J., Thygesen, M. B., Duus, J. Ø., Petersen, B. O., Thirup, S., James, E., Jensen, K. J., Stougaard, J., and Radutoiu, S. 2010. Improved characterization of nod factors and genetically based variation in LysM Receptor domains identify amino acids expendable for nod factor recognition in *Lotus* spp. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23:58-66.
- Beringer, J. E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 84:188-198.
- Breedveld, M. W., and Miller, K. J. 1998. Cell-surface β -glucans. Pages 81-96 in: *The Rhizobiaceae*. Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria. H. P. Spink, A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas, eds. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- Buendía-Clavería, A. M., Chamber, M., and Ruiz-Sainz, J. E. 1989. A comparative study of the physiological characteristics, plasmid content and symbiotic properties of different *Rhizobium fredii* strains. *Syst. Appl. Microbiol.* 12:203-209.
- Buendía-Clavería, A. M., Moussaid, A., Ollero, F. J., Vinardell, J. M., Torres, A., Moreno, J., Gil-Serrano, A. M., Rodríguez-Carvajal, M. A., Tejero-Mateo, P., Peart, J. L., Brewin, N. J., and Ruiz-Sainz, J. E. 2003. A *purL* mutant of *Sinorhizobium fredii* HH103 is symbiotically defective and altered in its lipopolysaccharide. *Microbiology* 149:1807-1818.
- Buendía-Clavería, A. M., Rodríguez-Navarro, D. N., Santamaría-Linaza, C., Ruiz-Sainz, J. E., and Temprano-Vera, F. 1994. Evaluation of the symbiotic properties of *Rhizobium fredii* in European soils. *Syst. Appl. Microbiol.* 17:155-160.
- Buendía-Clavería, A. M., Ruiz-Sainz, J. E., Cubo-Sánchez, T., and Pérez-Silva, J. 1986. Studies of symbiotic plasmids in *Rhizobium trifolii* and fast-growing bacteria that nodulate soybeans. *J. Appl. Bacteriol.* 61:1-9.
- Crespo-Rivas, J. C., Margaret, I., Hidalgo, A., Buendía-Clavería, A. M., Ollero, F. J., López-Baena, F. J., del Socorro Murdoch, P., Rodríguez-Carvajal, M. A., Soria-Díaz, M. E., Reguera, M., Lloret, J., Sumpton, D. P., Mosely, J. A., Thomas-Oates, J. E., van Brussel, A. A. N., Gil-Serrano, A., Vinardell, J. M., and Ruiz-Sainz, J. E. 2009. *Sinorhizobium fredii* HH103 *cgs* mutants are unable to nodulate determinate- and indeterminate nodule-forming legumes and overproduce an altered EPS. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22:575-588.
- Crespo-Rivas, J. C., Margaret, I., Pérez-Montaña, F., López-Baena, F. J., Vinardell, J. M., Ollero, F. J., Moreno, J., Ruiz-Sainz, J. E., and Buendía-Clavería, A. M. 2007. A *pyrF* auxotrophic mutant of *Sinorhizobium fredii* HH103 impaired in its symbiotic interactions with soybean and other legumes. *Int. Microbiol.* 10:169-176.
- Cubo, M. T., Buendía-Clavería, A. M., Beringer, J. E., and Ruiz-Sainz, J. E. 1988. Melanin production by *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1812-1817.
- D'Antuono, A. L., Casabuono, A., Couto, A., Ugalde, R. A., and Lepek, V. C. 2005. Nodule development induced by *Mesorhizobium loti* mutant strains affected in polysaccharide synthesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:446-457.
- Degtjareva, G. V., Kramina, T. E., Sokoloff, D. D., Samigullin, T. H., Sandral, G., and Valiejo-Roman, C. M. 2008. New data on nrITS phylogeny of *Lotus* (Leguminosae, Loteae). *Wulfenia* 15:35-49.
- Dowdle, S. F., and Bohloul, B. B. 1985. Predominance of fast-growing *Rhizobium japonicum* in a soybean field in the People's Republic of China. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:1171-1176.
- Downie, J. A. 2010. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol. Rev.* 34:150-170.
- Dylan, T., Ielpi, L., Stanfield, S., Kashyap, L., Douglas, C., Yanofsky, M., Nester, E., Helinski, D. R., and Ditta, G. 1986. *Rhizobium meliloti* genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:4403-4407.
- Gil-Serrano, A. M., Franco-Rodríguez, G., Tejero-Mateo, P., Thomas-Oates, J., Spink, H. P., Ruiz-Sainz, J. E., Megías, M., and Lamrabet, Y. 1997. Structural determination of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals produced by *Rhizobium fredii* HH103. *Carbohydr. Res.* 303:435-443.
- Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J. C., Jaubert, M., Simon, D., Cartieux, F., Prin, Y., Bena, G., Hannibal, L., Fardoux, J., Kojadinovic, M., Vuillet, L., Lajus, A., Cruveiller, S., Rouy, Z., Mangenot, S., Segurens, B., Dossat, C., Franck, W. L., Chang, W. S., Saunders, E., Bruce, D., Richardson, P., Normand, P., Dreyfus, B., Pignol, D., Stacey, G., Emerich, D., Verméglio, A., Médigue, C., and Sadowsky, M. 2007. Legumes symbioses: Absence of *Nod* genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science* 316:1307-1312.
- Gossmann, J. A., Markmann, K., Brachmann, A., Rose, L. E., and Parniske, M. 2012. Polymorphic infection and organogenesis patterns induced by a *Rhizobium leguminosarum* isolate from *Lotus* root nodules are determined by the host genotype. *New Phytol.* 196:561-573.
- Griffitts, J. S., and Long, S. R. 2008. A symbiotic mutant of *Sinorhizobium meliloti* reveals a novel genetic pathway involving succinoglycan biosynthetic functions. *Mol. Microbiol.* 67:1292-1306.
- Handberg, K., and Stougaard, J. 1992. *Lotus japonicus*, an autogamous diploid legume species for classical and molecular genetics. *Plant J.* 2:487-496.
- Heckmann, A. B., Sandal, N., Bek, A. S., Madsen, L. H., Jurkiewicz, A., Nielsen, M. W., Tirichine, L., and Stougaard, J. 2011. Cytokinin induction of root nodule primordia in *Lotus japonicus* is regulated by a mechanism operating in the root cortex. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24:1385-1395.
- Hidalgo, A., Margaret, I., Crespo-Rivas, J. C., Parada, M., Murdoch, Pdel. S., López, A., Buendía-Clavería, A. M., Moreno, J., Albareda, M., Gil-Serrano, A. M., Rodríguez-Carvajal, M. A., Palacios, J. M., Ruiz-Sainz, J. E., and Vinardell, J. M. 2010. The *rkpU* gene of *Sinorhizobium fredii* HH103 is required for bacterial K-antigen polysaccharide production and for efficient nodulation with soybean but not with cowpea. *Microbiology* 156:3398-3411.
- Kawaguchi, M., Motomura, T., Imaizumi-Anraku, H., Akao, S., and Kawasaki, S. 2001. Providing the basis for genomics in *Lotus japonicus*: The accessions Miyakojima and Gifu are appropriate crossing partners for genetic analyses. *Mol. Genet. Genomics* 266:157-166.
- Kawaguchi, M., Pedrosa-Harand, A., Yano, K., Hayashi, M., Murooka, Y., Saito, K., Nagata, T., Namai, K., Nishida, H., Shibata, D., Sato, S., Tabata, S., Hayashi, M., Harada, K., Sandal, N., Stougaard, J., Bachmair, A., and Grant, W. F. 2005. *Lotus burtii* takes a position of the third corner in the lotus molecular genetics triangle. *DNA Res.* 12:69-77.
- Kawaharada, Y., Eda, S., Minamisawa, K., and Mitsui, H. 2007. A *Mesorhizobium loti* mutant with reduced glucan content shows defective invasion of its host plant *Lotus japonicus*. *Microbiology* 153:3983-3993.
- Kawaharada, Y., Kelly, S., Nielsen, M. W., Hjuler, C. T., Gysel, K., Muszyński, A., Carlson, R. W., Thygesen, M. B., Sandal, N., Asmussen, M. H., Vinther, M., Andersen, S. U., Krusell, L., Thirup, S., Jensen, K. J., Ronson, C. W., Blaise, M., Radutoiu, S., and Stougaard, J. 2015. Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature* 523:308-312.
- Kawaharada, Y., Kiyota, H., Eda, S., Minamisawa, K., and Mitsui, H. 2008. Structural characterization of neutral and anionic glucans from *Mesorhizobium loti*. *Carbohydr. Res.* 343:2422-2427.
- Kawaharada, Y., Kiyota, H., Eda, S., Minamisawa, K., and Mitsui, H. 2010. Identification of the *Mesorhizobium loti* gene responsible for glycerophosphorylation of periplasmic cyclic β -1,2-glucans. *FEMS Microbiol. Lett.* 302:131-137.
- Kelly, S. J., Muszyński, A., Kawaharada, Y., Hubber, A. M., Sullivan, J. T., Sandal, N., Carlson, R. W., Stougaard, J., and Ronson, C. W. 2013. Conditional requirement for exopolysaccharide in the *Mesorhizobium-Lotus* symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26:319-329.
- Kereszt, A., Kiss, E., Reuhs, B. L., Carlson, R. W., Kondorosi, A., and Putnoky, P. 1998. Novel *rkp* gene clusters of *Sinorhizobium meliloti* involved in capsular polysaccharide production and invasion of the symbiotic nodule: The *rkpK* gene encodes a UDP-glucose dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 180:5426-5431.
- Krol, E., and Becker, A. 2009. Surface polysaccharides as fitness factors of rhizospheric nitrogen-fixing bacteria. Pages 189-211 in: *Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends*. M. Ullrich, ed. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Lamrabet, Y., Bellogín, R. A., Cubo, T., Espuny, R., Gil, A., Krishnan, H. B., Megías, M., Ollero, F. J., Pueppke, S. G., Ruiz-Sainz, J. E., Spink, H. P., Tejero-Mateo, P., Thomas-Oates, J., and Vinardell, J. M. 1999. Mutation in GDP-fucose synthesis genes of *Sinorhizobium fredii* alters Nod factors and significantly decreases competitiveness to nodulate soybeans. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:207-217.
- López-Baena, F. J., Ruiz-Sainz, J. E., Rodríguez-Carvajal, M. A., and Vinardell, J. M. 2016. Bacterial molecular signals in the *Sinorhizobium fredii*-soybean symbiosis. *Int. J. Mol. Sci.* 17:755.
- López-Lara, I. M., van den Berg, J. D. J., Thomas-Oates, J. E., Glushka, J., Lugtenberg, B. J., and Spink, H. P. 1995. Structural identification of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals of *Rhizobium loti*. *Mol. Microbiol.* 15:627-638.
- Madinabeitia, N., Bellogín, R. A., Buendía-Clavería, A. M., Camacho, M., Cubo, T., Espuny, M. R., Gil-Serrano, A. M., Lyra, M. C., Moussaid, A., Ollero, F. J., Soria-Díaz, M. E., Vinardell, J. M., Zeng, J., and Ruiz-Sainz, J. E. 2002. *Sinorhizobium fredii* HH103 has a truncated *nolO* gene due to a -1 frameshift mutation that is conserved among other

- geographically distant *S. fredii* strains. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15: 150-159.
- Madsen, L. H., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J. T., Heckmann, A. B., Bek, A. S., Ronson, C. W., James, E. K., and Stougaard, J. 2010. The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat. Commun.* 1:10.
- Maekawa, T., Maekawa-Yoshikawa, M., Takeda, N., Imaizumi-Anraku, H., Murooka, Y., and Hayashi, M. 2009. Gibberellin controls the nodulation signaling pathway in *Lotus japonicus*. *Plant J.* 58:183-194.
- Margaret, I., Becker, A., Blom, J., Bonilla, I., Goesmann, A., Göttfert, M., Lloret, J., Mittard-Runte, V., Rückert, C., Ruiz-Sainz, J. E., Vinardell, J. M., and Weidner, S. 2011. Symbiotic properties and first analyses of the genomic sequence of the fast growing model strain *Sinorhizobium fredii* HH103 nodulating soybean. *J. Biotechnol.* 155:11-19.
- Margaret, I., Crespo-Rivas, J. C., Acosta-Jurado, S., Buendía-Clavería, A. M., Cubo, M. T., Gil-Serrano, A., Moreno, J., Murdoch, P. S., Rodríguez-Carvajal, M. A., Rodríguez-Navarro, D. N., Ruiz-Sainz, J. E., Sanjuan, J., Soto, M. J., and Vinardell, J. M. 2012. *Sinorhizobium fredii* HH103 *rkp-3* genes are required for K-antigen polysaccharide biosynthesis, affect lipopolysaccharide structure and are essential for infection of legumes forming determinate nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25:825-838.
- Margaret, I., Lucas, M. M., Acosta-Jurado, S., Buendía-Clavería, A. M., Fedorova, E., Hidalgo, Á., Rodríguez-Carvajal, M. A., Rodríguez-Navarro, D. N., Ruiz-Sainz, J. E., and Vinardell, J. M. 2013. The *Sinorhizobium fredii* HH103 lipopolysaccharide is not only relevant at early soybean nodulation stages but also for symbiosome stability in mature nodules. *PLoS One* 8:e74717.
- Margaret-Oliver, I., Lei, W., Parada, M., Rodríguez-Carvajal, M. A., Crespo-Rivas, J. C., Hidalgo, Á., Gil-Serrano, A., Moreno, J., Rodríguez-Navarro, D. N., Buendía-Clavería, A., Ollero, J., Ruiz-Sainz, J. E., and Vinardell, J. M. 2012. *Sinorhizobium fredii* HH103 does not strictly require KPS and/or EPS to nodulate *Glycyrrhiza uralensis*, an indeterminate nodule-forming legume. *Arch. Microbiol.* 194:87-102.
- Morón, B., Soria-Díaz, M. E., Ault, J., Verroios, G., Noreen, S., Rodríguez-Navarro, D. N., Gil-Serrano, A., Thomas-Oates, J., Megías, M., and Sousa, C. 2005. Low pH changes the profile of nodulation factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899. *Chem. Biol.* 12:1029-1040.
- Müller, P., Hynes, M., Kapp, D., Niehaus, K., and Pühler, A. 1988. Two classes of *Rhizobium meliloti* infection mutants differ in exopolysaccharide production and in coinoculation properties with nodulation mutants. *Mol. Gen. Genet.* 211:17-26.
- Muszyński, A., Heiss, C., Hjulter, C. T., Sullivan, J. T., Kelly, S. J., Thygesen, M. B., Stougaard, J., Azadi, P., Carlson, R. W., and Ronson, C. W. 2016. Structures of exopolysaccharides involved in receptor-mediated perception of *Mesorhizobium loti* by *Lotus japonicus*. *J. Biol. Chem.* 291:20946-20961.
- Noel, K. D., Diebold, R. J., Cava, J. R., and Brink, B. A. 1988. Rhizobial purine and pyrimidine auxotrophs: Nutrient supplementation, genetic analysis, and the symbiotic requirement for de novo purine biosynthesis. *Arch. Microbiol.* 149:499-506.
- Noel, K. D., Vandenbosch, K. A., and Kulpaca, B. 1986. Mutations in *Rhizobium phaseoli* that lead to arrested development of infection threads. *J. Bacteriol.* 168:1392-1401.
- Pacios Bras, C., Jordá, M. A., Wijffes, A. H. M., Harteveld, M., Stuurman, N., Thomas-Oates, J. E., and Spaink, H. P. 2000. A *Lotus japonicus* nodulation system based on heterologous expression of the fucosyl transferase NodZ and the acetyl transferase NoIL in *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:475-479.
- Parada, M., Vinardell, J. M., Ollero, F. J., Hidalgo, A., Gutiérrez, R., Buendía-Clavería, A. M., Lei, W., Margaret, I., López-Baena, F. J., Gil-Serrano, A. M., Rodríguez-Carvajal, M. A., Moreno, J., and Ruiz-Sainz, J. E. 2006. *Sinorhizobium fredii* HH103 mutants affected in capsular polysaccharide (KPS) are impaired for nodulation with soybean and *Cajanus cajan*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:43-52.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., and Bedmar, E. J. 2015. Bacterial associations with legumes. *Crit. Rev. Plant Sci.* 34:17-42.
- Pellock, B. J., Cheng, H. P., and Walker, G. C. 2000. Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *J. Bacteriol.* 182:4310-4318.
- Pueppke, S. G., and Broughton, W. J. 1999. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:293-318.
- Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Jurkiewicz, A., Fukai, E., Quistgaard, M. M., Albrektzen, A. S., James, E. K., Thirup, S., and Stougaard, J. 2007. LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 26:3923-3935.
- Rigaud, J., and Puppo, A. 1975. Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 88:223-228.
- Rodpithong, P., Sullivan, J. T., Songsrirote, K., Sumpton, D., Cheung, K. W. J.-T., Thomas-Oates, J., Radutoiu, S., Stougaard, J., and Ronson, C. W. 2009. Nodulation gene mutants of *Mesorhizobium loti* R7A-*nodZ* and *nolL* mutants have host-specific phenotypes on *Lotus* spp. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22:1546-1554.
- Rodríguez-Navarro, D. N., Rodríguez-Carvajal, M. A., Acosta-Jurado, S., Soto, M. J., Margaret, I., Crespo-Rivas, J. C., Sanjuan, J., Temprano, F., Gil-Serrano, A., Ruiz-Sainz, J. E., and Vinardell, J. M. 2014. Structure and biological roles of *Sinorhizobium fredii* HH103 exopolysaccharide. *PLoS One* 9:e115391.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
- Sandal, N., Jin, H., Rodríguez-Navarro, D. N., Temprano, F., Cvitanich, C., Brachmann, A., Sato, S., Kawaguchi, M., Tabata, S., Parniske, M., Ruiz-Sainz, J. E., Andersen, S. U., and Stougaard, J. 2012. A set of *Lotus japonicus* Gifu × *Lotus burtii* recombinant inbred lines facilitates map-based cloning and QTL mapping. *DNA Res.* 19:317-323.
- Simon, R. 1984. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vitro constructed Tn5-Mob transposon. *Mol. Gen. Genet.* 196:413-420.
- Sprent, J. I. 2007. Evolving ideas of legume evolution and diversity: A taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytol.* 174:11-25.
- Stacey, G., So, J. S., Roth, L. E., Lakshmi SK, B., and Carlson, R. W. 1991. A lipopolysaccharide mutant of *Bradyrhizobium japonicum* that uncouples plant from bacterial differentiation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4:332-340.
- Sullivan, J. T., Patrick, H. N., Lowther, W. L., Scott, D. B., and Ronson, C. W. 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:8985-8989.
- Sullivan, J. T., and Ronson, C. W. 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:5145-5149.
- Sz.-Borsos, O., Somaroo, B. H., and Grant, W. F. 1972. A new diploid species of *Lotus* (Leguminosae) in Pakistan. *Can. J. Bot.* 50:1865-1870.
- Townsend, G. E., 2nd, Forsberg, L. S., and Keating, D. H. 2006. *Mesorhizobium loti* produces *nodPQ*-dependent sulfated cell surface polysaccharides. *J. Bacteriol.* 188:8560-8572.
- Townsend, G. E., 2nd, and Keating, D. H. 2008. Identification and characterization of KpsS, a novel polysaccharide sulphotransferase in *Mesorhizobium loti*. *Mol. Microbiol.* 68:1149-1164.
- van Brussel, A. A. N., Planque, K., and Quispel, A. 1977. The wall of *Rhizobium leguminosarum* in bacteroid and free-living forms. *J. Gen. Microbiol.* 101:51-56.
- Vinardell, J. M., Acosta-Jurado, S., Zehner, S., Göttfert, M., Becker, A., Baena, I., Blom, J., Crespo-Rivas, J. C., Goesmann, A., Jaenicke, S., Krol, E., McIntosh, M., Margaret, I., Pérez-Montaño, F., Schneiker-Bekel, S., Serranía, J., Szczepanowski, R., Buendía, A. M., Lloret, J., Bonilla, I., Pühler, A., Ruiz-Sainz, J. E., and Weidner, S. 2015. The *Sinorhizobium fredii* HH103 genome: A comparative analysis with *S. fredii* strains differing in their symbiotic behavior with soybean. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 28:811-824.
- Vinardell, J. M., Ollero, F. J., Hidalgo, A., López-Baena, F. J., Medina, C., Ivanov-Vangelov, K., Parada, M., Madinabeitia, N., Espuny, Mdel. R., Bellogín, R. A., Camacho, M., Rodríguez-Navarro, D. N., Soria-Díaz, M. E., Gil-Serrano, A. M., and Ruiz-Sainz, J. E. 2004. NoIR regulates diverse symbiotic signals of *Sinorhizobium fredii* HH103. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:676-685.
- Vincent, J. M. 1970. The modified Fähræus slide technique. Appendix III. Pages 144-145 in: *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. J. M. Vincent, ed. Blackwell Scientific, Oxford.
- Ward, L. J., Rockman, E. S., Ball, P., Jarvis, B. D., and Scott, D. B. 1989. Isolation and characterization of a *Rhizobium loti* gene required for effective nodulation of *Lotus pedunculatus*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2:224-232.

Capítulo III:

Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., Murdoch, P. del S., Crespo-Rivas, J.C., Jie, S., Cuesta-Berrio, L., Ruiz-Sainz, J.E., Rodríguez-Carvajal, M.A., Vinardell, J.M. 2016b. Exopolysaccharide production by *Sinorhizobium fredii* HH103 is repressed by genistein in a NodD1-dependent manner. PLoS One. 11:e0160499.

RESEARCH ARTICLE

Exopolysaccharide Production by *Sinorhizobium fredii* HH103 Is Repressed by Genistein in a NodD1-Dependent Manner

Sebastián Acosta-Jurado¹, Pilar Navarro-Gómez¹, Piedad del Socorro Murdoch², Juan-Carlos Crespo-Rivas¹, Shi Jie^{1*}, Lidia Cuesta-Berrio³, José-Enrique Ruiz-Sainz¹, Miguel-Ángel Rodríguez-Carvajal³, José-María Vinardell^{1*}

1 Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain,

2 Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain, **3** Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

✉ Current address: Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Sciences, Daqing, P. R. of China

* jvinar@us.es



OPEN ACCESS

Citation: Acosta-Jurado S, Navarro-Gómez P, Murdoch PdS, Crespo-Rivas J-C, Jie S, Cuesta-Berrio L, et al. (2016) Exopolysaccharide Production by *Sinorhizobium fredii* HH103 Is Repressed by Genistein in a NodD1-Dependent Manner. PLoS ONE 11(8): e0160499. doi:10.1371/journal.pone.0160499

Editor: Francisco Martínez-Abarca, Estación Experimental del Zaidín—CSIC, SPAIN

Received: April 5, 2016

Accepted: July 20, 2016

Published: August 3, 2016

Copyright: © 2016 Acosta-Jurado et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information file. RNAseq data mentioned are available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA313151>

Funding: This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (<http://www.idi.mineco.gob.es/portal/site/MICINN/>) (project BIO2011-30229-C02-01) and the Andalusia Government (<http://www.juntadeandalucia.es/organismos/economia-y-conocimiento.html>) (project P11-CVI-7500 of Junta de Andalucía). SAJ and PNG

Abstract

In the rhizobia-legume symbiotic interaction, bacterial surface polysaccharides, such as exopolysaccharide (EPS), lipopolysaccharide (LPS), K-antigen polysaccharide (KPS) or cyclic glucans (CG), appear to play crucial roles either acting as signals required for the progression of the interaction and/or preventing host defence mechanisms. The symbiotic significance of each of these polysaccharides varies depending on the specific rhizobia-legume couple. In this work we show that the production of exopolysaccharide by *Sinorhizobium fredii* HH103, but not by other *S. fredii* strains such as USDA257 or NGR234, is repressed by *nod* gene inducing flavonoids such as genistein and that this repression is dependent on the presence of a functional NodD1 protein. In agreement with the importance of EPS for bacterial biofilms, this reduced EPS production upon treatment with flavonoids correlates with decreased biofilm formation ability. By using quantitative RT-PCR analysis we show that expression of the *exoY2* and *exoK* genes is repressed in late stationary cultures of *S. fredii* HH103 upon treatment with genistein. Results presented in this work show that in *S. fredii* HH103 EPS production is regulated just in the opposite way than other bacterial signals such as Nod factors and type 3 secreted effectors: it is repressed by flavonoids and NodD1 and enhanced by the *nod* repressor NodR. These results are in agreement with our previous observations showing that lack of EPS production by *S. fredii* HH103 is not only non-detrimental but even beneficial for symbiosis with soybean.

Introduction

Rhizobia are soil α - and β -proteobacteria able to establish a nitrogen-fixing symbiosis with legumes. In this interaction, rhizobia induce the formation of new plant organs, called nodules, on legume roots. Inside nodule cells, rhizobia differentiate into nitrogen fixing bacteroids which provide the plant with ammonia and receive in turns organic acids [1].

are recipients of PhD grants from the VPPI from the University of Seville (<https://investigacion.us.es/secretariado-investigacion/plan-propio>). The authors also acknowledge the European Regional Development Fund (FEDER) for financial support. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

The nodulation process relies on a complex molecular dialogue between plant and bacteria [2–4]. The first step is the secretion of phenolic compounds called flavonoids by plant roots. The bacterial protein NodD, upon interaction with appropriate flavonoids, binds to conserved DNA sequences, called *nod* boxes, and induces the expression of bacterial *nod* genes, responsible for the synthesis and secretion of molecular signals known as Nod factors. In several rhizobial species, such as *Sinorhizobium meliloti* and *S. fredii*, fine-tuning modulation of *nod* gene expression is achieved by the participation of NodR, a transcriptional repressor protein [5, 6]. Recognition of appropriate Nod factors by LysM plant receptors induces early events of the nodulation process such as root hair curling and nodule primordium formation [7].

In addition to Nod factors, other bacterial molecules are required for a successful interaction [2–4]. Several rhizobia (including *S. fredii* strains) deliver effector proteins into plant cells through a symbiotic type 3 secretion system in a process that is also dependent on NodD and plant flavonoids [8]. These rhizobial effectors manipulate host cells in order to suppress defensive responses against rhizobia and to promote symbiosis-related processes.

In addition, several rhizobial surface polysaccharides have been demonstrated to play important roles in symbiosis, acting as signals molecules and/or preventing plant defense responses [2, 3, 9]: cyclic glucans (CG), which are cycled polymers of glucose located on the periplasm, lipopolysaccharide (LPS) and K-antigen capsular polysaccharide (KPS), which are constituents of the outer leaf of the external membrane, and exopolysaccharides (EPS), which are acidic polysaccharides located out of the cell with little or no cell association. With the exception of CG, which have been proven to be essential in all rhizobia-legume symbiosis tested so far, the relevance of these polysaccharides depends on the specific rhizobia-legume interaction analyzed [3, 10].

EPS provide protection against different stresses such as desiccation or the presence of antimicrobial compounds and have a role in attachment to surfaces and in biofilm formation [9, 11]. EPS produced by rhizobia are highly variable but mainly contain common monosaccharides such as D-glucose, D-galactose, D-mannose, as well as D-glucuronic and D-galacturonic acids. In addition, often several non-carbohydrate substituents, such as O-acetyl groups or ketal-linked pyruvate and succinyl half ester groups, are also found. Very recently we have reported the structure of the *S. fredii* HH103 EPS, which is composed of glucose, galactose, glucuronic acid, pyruvic acid (5:2:2:1) and is partially acetylated [12]. Rhizobial EPS is essential in several interactions with legumes forming indeterminate nodules, such as *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago* or *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*-*Trifolium* [11 and references therein], but this is not always the case. Thus, an *exoA* (EPS[−]) mutant of *S. fredii* HH103 is slightly impaired but still effective in its interaction with *Glycyrrhiza uralensis* or *Cajanus cajan* [10, 13]. In addition, this *S. fredii* HH103 *exoA* mutant is fully effective with *Glycine max* (soybean) or *Vigna unguiculata* [13, 14], two legumes forming determinate nodules, and it even shows increased competitiveness to nodulate soybean [12].

Several reports indicate that *nod* gene inducing flavonoids, such as apigenin or genistein, can affect the production of *S. fredii* surface polysaccharides. Thus, in strain NGR234 the presence of apigenin reduces the amount of KPS produced and elicits the synthesis of a novel kind of LPS rich in rhamnose in a NodD-dependent manner [15, 16]. None of these changes have been found in *S. fredii* HH103 [14, 17] or, to our knowledge, in other *S. fredii* strains. In 1992, Dunn et al. [18] reported that genistein provokes alterations in the molecular mass and the composition of *S. fredii* USDA193 EPS. More recently, we reported that both the presence of this flavonoid and the inactivation of *nolR* results in a non-mucoid phenotype in *S. fredii* HH103 [6].

In this work we have further investigated the relation between the *nod* regulatory network and EPS production in *S. fredii* HH103. We show that the effect of flavonoids on EPS

production is related to their *nod* gene induction ability and, moreover, that it is absolutely dependent on NodD1. The non-mucoid phenotype is due to a decrease in EPS production and not to structural changes. This reduced EPS production is, at least partially, related to a decrease in the level of transcripts of the *exoY2* and *exoK* genes in stationary phase cultures, although the exact way in which this expression is modulated remains to be elucidated.

Material and Methods

Microbiological techniques

Sinorhizobium fredii strains HH103 Rif^R [19], SVQ116 (= HH103 Rif^R *nodA*::Tn5-B20, [20]), SVQ530 (= HH103 Rif^R *exoA*::*lacZ*Δp::Gm^R [13]), SVQ502 (= HH103 Rif^R *nodD1*::*lacZ*Δp::Gm^R [21]), SVQ548 (= HH103 Rif^R *nolR*::*lacZ*Δp::Gm^R, this work), and SVQ554 (= HH103 Rif^R *nodD2*::*lacZ*Δp::Gm^R, this work) were grown at 28°C on TY medium [22], yeast extract/ mannitol (YM) medium [23] or MGM medium [24]. Plasmids pMUS296 and pMUS746 are pMP92 derivatives containing the *nodD1* and the *nodD2* genes of *S. fredii* HH103, respectively [21, 25]. The *nolR* and *nodD2* mutant derivatives of HH103 used in this work were constructed by homogenotization of a copy of the gene truncated by the *lacZ*Δp-Gm^R cassette [26] following methodologies previously used by our group [10, 13, 14, 21]. *S. fredii* strains USDA257 [27] and NGR234 [28] and *S. meliloti* Rm1021 [29] were cultured on YM medium. *Escherichia coli* was cultured on Luria-Bertani (LB) medium [30] at 37°C. When required, the media were supplemented with the appropriate antibiotics as described by Vinardell et al. [21]. Flavonoids were dissolved in ethanol at a concentration of 1 mg/mL and used at 1 μg/mL. Plasmids were transferred from *E. coli* to rhizobia by triparental mating by using pRK2013 as the helper plasmid [31]. The Optical Density (OD) of bacterial cultures was determined by using a Pharmacia LKB Novaspec II spectrophotometer.

For analysis of EPS production in solid media, 20 μl droplets of YMB-grown early log (OD₆₀₀ = 0.4) cultures were placed onto YMA plates supplemented with ethanol or flavonoids (flavone, genistein, or luteolin), incubated at 28°C for 96 hours and photographed. For EPS quantification, bacterial cultures were grown in YM for 96 hours at 28°C (OD₆₀₀ = 1.2–1.3) under shaking conditions. Cells were removed by centrifugation (20000 g, 15 min) and total carbohydrate amounts of the EPS-containing supernatants were determined using the anthrone-H₂SO₄ method, which measures the total glucose equivalents content in a given sample, as previously described [32]. Four independent experiments in duplicate were carried out. Assays for biofilm formation on plastic surfaces were carried out as described by Rodríguez-Navarro et al. [12]. Data presented are the media of at least three independent experiments performed in duplicate; in each experiment, at least 12 wells for each treatment were measured.

Molecular techniques

Recombinant DNA techniques were performed according to the general protocols of Sambrook et al. [30]. PCR amplifications and hybridisations were performed as previously described [6]. For measuring expression of the *exoA*, *exoK*, *exoY2* and *exoA* genes, quantitative RT-PCR experiments were performed by using primer pairs rt-*exoA*-F2/R2, rt-*exoK*-F/R, *exoY2*rt-F/R, and *qnodA*-F/R respectively. The *S. fredii* HH103 16S rRNA was used as an internal control to normalize gene expression (primer pair rt-16S-F2/R2). All primer pairs used are shown in S1 Table. Total RNA was isolated using the High Pure RNA Isolation Kit (Roche) and RNase Free DNA Set (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. This (DNA free) RNA was reverse transcribed to cDNA by using PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara). Quantitative PCR was performed using a LightCycler 480 (Roche, Switzerland) with the following conditions: 95°C, 10 min; 95°C, 30 s; 50°C, 30 s; 72°C, 20 s; forty

cycles, followed by the melting curve profile from 60 to 95°C to verify the specificity of the reaction. The fold changes of three biological samples with three technical replicates in each condition were obtained using the $\Delta\Delta C_t$ method.

Statistical analyses

For each strain and condition, the capacity of biofilm formation, the amount of glucose equivalents produced and the expression level of *nodA* and *exo* genes were compared to those of the wild type strain grown in the absence of genistein by using the Mann-Whitney non-parametrical test.

Chemical analyses of EPS

For isolation of bacterial EPS, culture media were concentrated up to 20% of the initial volume on a rotary evaporator and three volumes of cold ethanol were added. After 24 h at 4°C, the resulting precipitates were separated by centrifugation, redissolved in water and purified by dialysis against distilled water. Finally, the solutions were concentrated and freeze dried. For NMR experiments, 1–5 mg of samples were deuterium-exchanged several times by freeze-drying from D₂O and then examined in solution (1–5 mg/750 mL of 99.96% D₂O). Spectra were recorded at 353 K on a Bruker AV500 spectrometer operating at 500.20 MHz (¹H). Chemical shifts are given in ppm, using the HDO signal (4.22 ppm at 353 K) as reference [33].

Results

Sinorhizobium fredii HH103 EPS production is regulated by *nod* gene inducing flavonoids

Previous results of our research group had shown that the mucoidy of *S. fredii* HH103 in YM medium is negatively affected by the presence of genistein, a flavonoid present in soybean root exudates that is an effective *nod* gene inducer of this strain [6]. This result prompted us to investigate whether this effect also took place in other *S. fredii* strains. The ineffective *nod* gene inducer flavone [21] and ethanol (the organic solvent used to dissolve flavonoids) were used as negative controls of the effect of genistein. In addition to *S. fredii* strains, *S. meliloti* Rm1021 was also included in this experiment since it has been reported that flavonoids has a slight inducer effect on EPS I production in this strain [34]. For this reason, in addition to genistein, we also investigated the effect of luteolin, a *Medicago sativa* root-exuded flavonoid that is an effective *nod* gene inducer for both *S. meliloti* and *S. fredii* [21, 35].

Results presented in Fig 1 indicate that, among the different *S. fredii* strains tested, the flavonoid effect on EPS production appears to be specific for HH103. Thus, *S. fredii* HH103 presented a rough appearance when grown in YMA plates supplemented with genistein or luteolin, whereas the mucoidy of strains USDA257 and NGR234 was apparently not affected by the presence of these flavonoids. The slight positive effect of luteolin on EPS I production by Rm1021 could not be noticed by this approach. The appearance of *S. fredii* HH103 was not altered in YMA plates supplemented with either ethanol or flavone, indicating that neither the organic solvent used to dissolve flavonoids nor flavonoids ineffective as *nod* gene inducers affect *S. fredii* HH103 mucoidy.

Flavonoid-mediated regulation of *S. fredii* HH103 EPS depends on the regulatory genes *nodD1* and *noIR*

Since only those flavonoids effective as *nod* inducers have a negative effect on *S. fredii* HH103 EPS production, we decided to investigate whether there is a connection between the *nod*

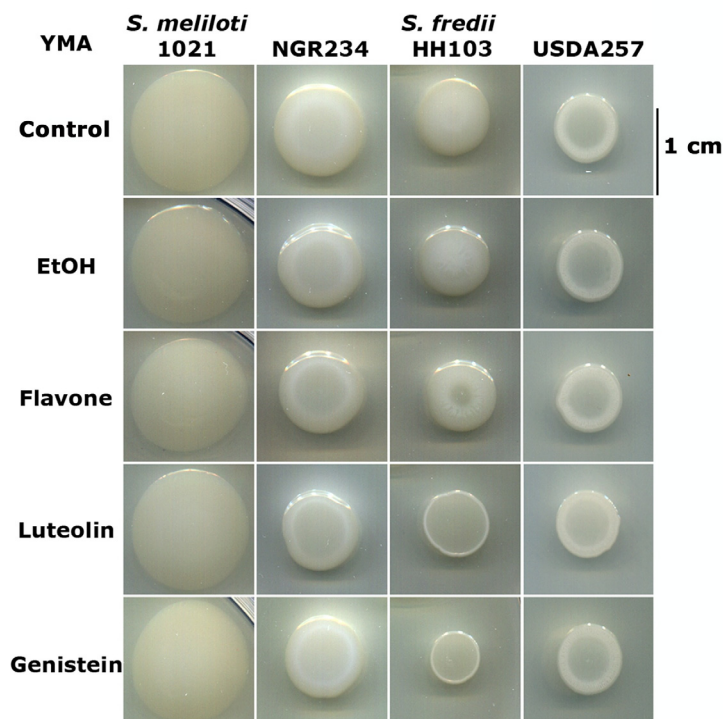


Fig 1. Mucoidy of different sinorhizobial strains in YMA medium in the presence or absence of flavonoids. Compounds used for supplementing YMA medium are indicated on the left.

doi:10.1371/journal.pone.0160499.g001

regulon and EPS production in *S. fredii* HH103. For this purpose we analyzed the effect of genistein on the mucoidy of the wild type strain as well as of HH103 derivatives affected in *nodA* (unable to produce Nod factors) and in different *nod* regulatory genes present in this strain [6, 17, 21, 36]: *nodD1*, *nodD2*, and *nolR* (Fig 2). Strain SVQ530, an HH103 *exoA* derivative defective in EPS production [12], was employed as negative control for EPS production.

As expected, regardless the presence or absence of flavonoids, HH103 *exoA* showed a rough appearance. The presence of genistein, but not that of flavone, led to a decrease in mucoidy in the wild type strain and in its *nodD2* and *nodA* derivatives. Interestingly, in the absence of flavonoids or in the presence of flavone, the appearance of the *nodA* derivative was different to that of the wild type since disruptions in the mucoidy could be observed in the former strain. As previously described [6], lack of *NolR* led to a less mucoid phenotype of *S. fredii* HH103 even in the absence of flavonoids, although this phenotype was more evident in the presence of genistein. In the *nodD1* mutant background the presence of genistein did not affect HH103 mucoidy. Consistently, introduction of the wild-type *nodD1* gene (harboured by plasmid pMUS296) restored the negative effect of genistein on mucoidy in the *nodD1* mutant and even reduced those of the wild type strain and its *nodD1* mutant in the absence of genistein. These results indicate that the genistein-mediated repression of HH103 mucoidy involves the participation of NodD1. However, introduction of extra copies of *nodD2* (carried by plasmid pMUS756) also reduced mucoidy in the wild type strain in the absence of flavonoids, suggesting that, when in overdose, NodD2 could mimic the mucoidy repression exerted by NodD1.

Production of EPS by *S. fredii* HH103 and its *nodA*, *nodD1*, and *nolR* mutant derivatives in the absence or presence of genistein was further investigated by quantification of the amount of glucose equivalents found in the extracellular milieu of cultures of these strains in YM broth (YMB) (Fig 3A). The HH103 *exoA* derivative was used as a negative control for production of

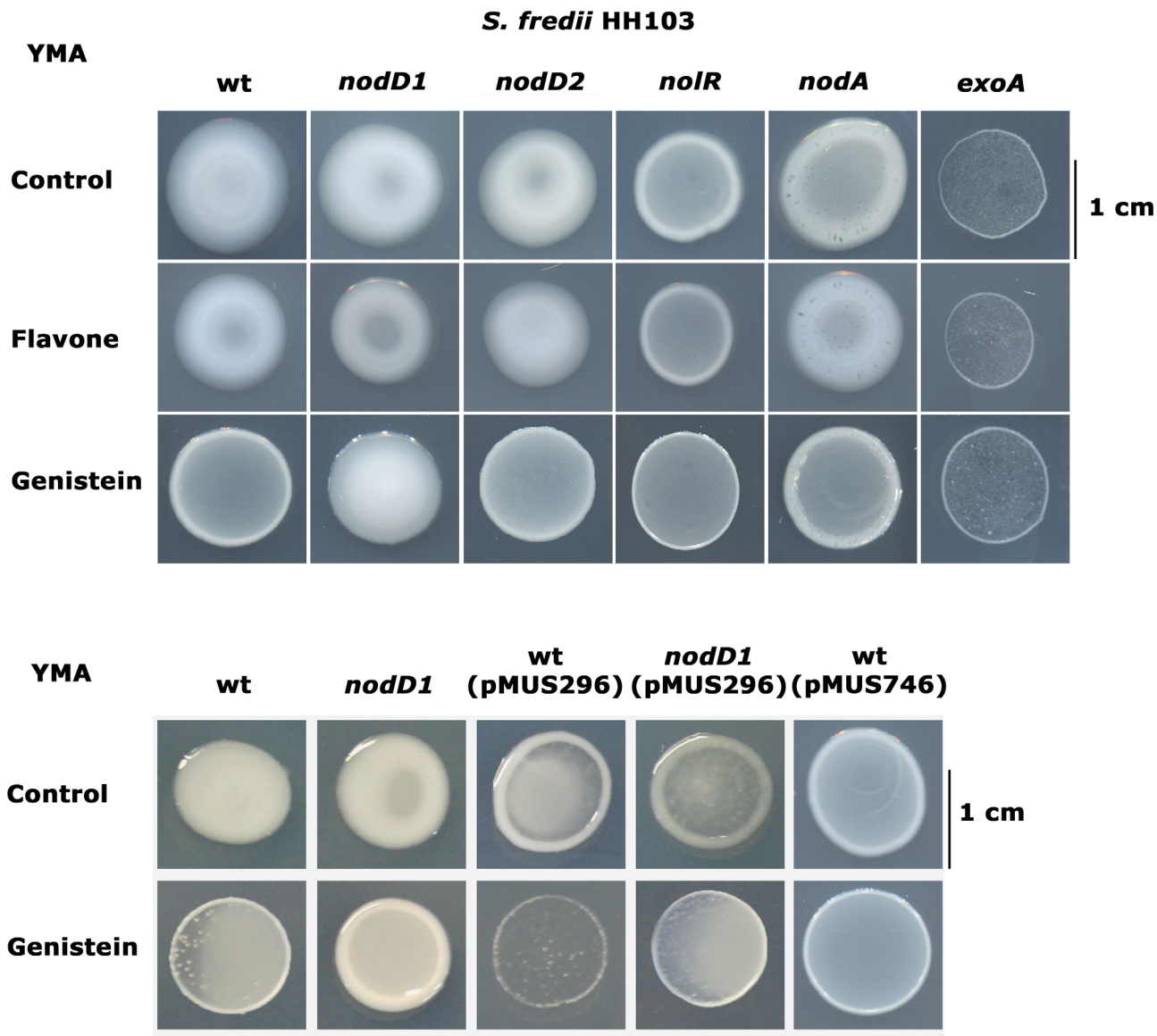


Fig 2. Mucoidy of *S. fredii* HH103 (wt) and different mutant derivatives in YMA in the absence or presence of flavone or genistein. The gene affected by the mutation in each strain is indicated on the top of each column. Plasmids pMUS296 and pMUS746 harbor wild-type copies of HH103 *nodD1* and *nodD2* respectively. Compounds used for supplementing YMA medium are indicated on the left. Control denotes absence of flavonoids.

doi:10.1371/journal.pone.0160499.g002

EPS. The low levels of glucose equivalents detected in HH103 *exoA* might correspond to other polysaccharides present in culture supernatants such as cyclic glucans. The presence of genistein reduced about 10-fold the amount of glucose equivalents produced by HH103 (to levels similar to that of the *exoA* mutant) but did not affect that of the HH103 *nodD1* derivative. In addition, the HH103 *nolR* derivative clearly produced less amount of glucose equivalents than the wild type strain, regardless the presence or absence of genistein. In the absence of flavonoids, the *nodA* derivative of HH103 produced similar amounts of glucose equivalents when compared to the wild type strain. Surprisingly, when genistein was present, the amount of glucose equivalents present in the extracellular milieu of HH103 *nodA* was significantly enhanced in comparison to those of the non-induced cultures of both the wild-type and the *nodA* mutant strains.

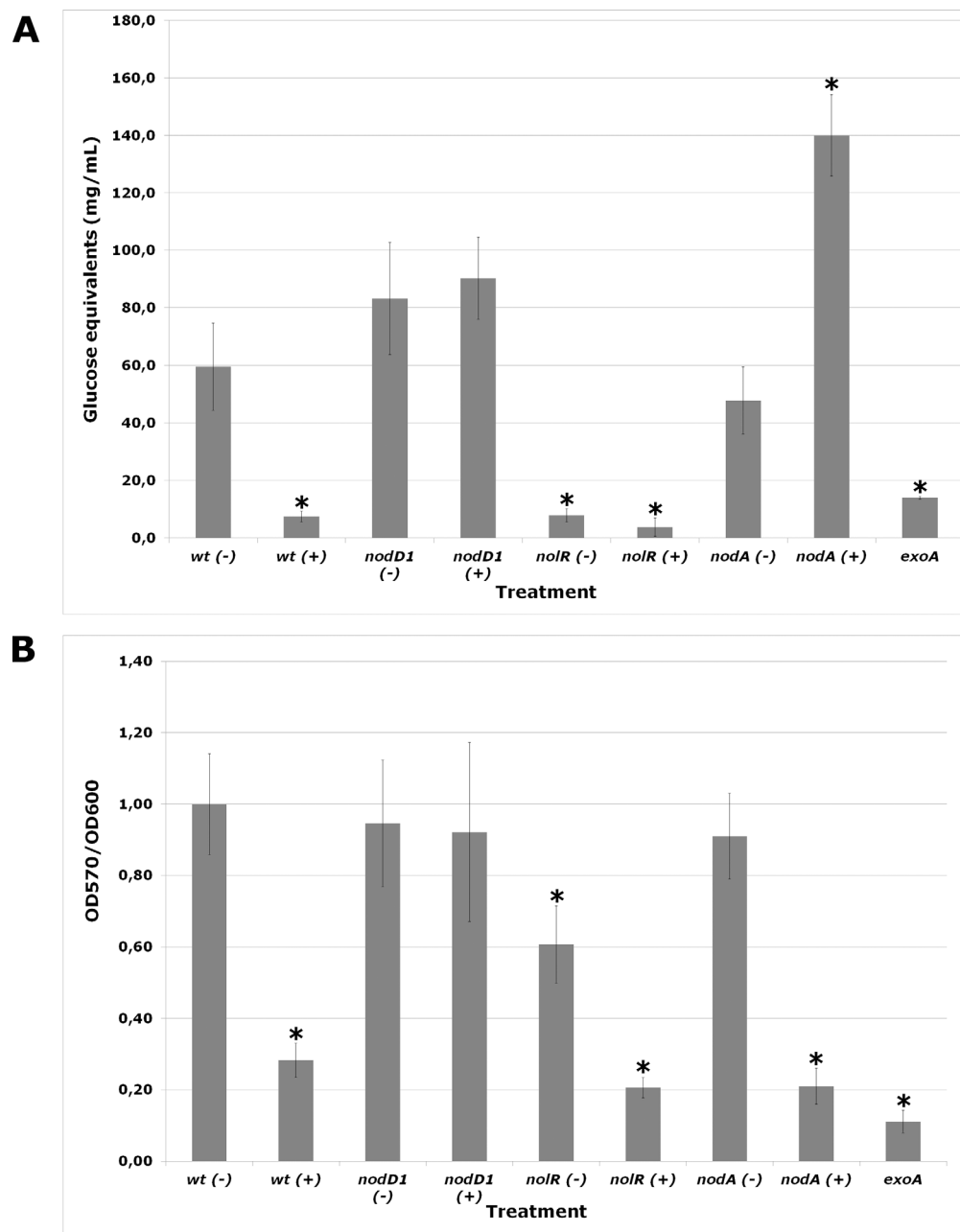


Fig 3. Glucose equivalents in the extracellular milieu (A) and biofilm formation ability (B) of *S. fredii* HH103 (wt) and its *nodA*, *nodD1*, *nolR* and *exoA* mutant derivatives grown in the presence (+) or absence (-) of genistein. The presence of an asterisk denotes a significant difference at the 0.01% level with respect to wt (-).

doi:10.1371/journal.pone.0160499.g003

In *S. fredii* HH103 EPS has been shown to be essential for biofilm formation ability onto plastic surfaces [12]. Because of this, we have investigated whether this bacterial capacity is also affected by the presence of genistein. The *exoA* derivative of HH103 was employed as negative control for biofilm formation. As shown in Fig 3B, the presence of genistein reduced dramatically biofilm formation ability in the wild-type but not in the *nodD1* mutant strain. The HH103 *nolR* derivative formed less amount of biofilm than the wild-type strain in the absence

of flavonoids, and was also negatively affected by the presence of genistein. However, the decrease in biofilm formation ability exhibited by this mutant was not as dramatic as the reduction in EPS production. This result might be due to the fact that NolR is a global regulator, so that its absence might affect other traits involved in bacterial attachment. The biofilm formation ability of the HH103 *nodA* derivative was similar to that of the parental strain, both in the absence or presence of genistein.

NMR experiments confirm that genistein diminishes *S. fredii* HH103 EPS production in a NodD1-dependent manner

Polysaccharides present in culture media were isolated and their ¹H-NMR spectra acquired. Fig 4 shows that when HH103 is grown in the absence of genistein (wt-), the isolate contains mainly its exopolysaccharide [12], together with minor components such as a mannan from yeast extract or small amounts of KPS [37]. Its *nodD1* derivative has the same behavior, either in the presence or the absence of genistein (*nodD1*- and *nodD1*+, respectively). Spectra from genistein-induced cultures of HH103 (wt+) and its *nolR* derivative (*nolR*+), on the contrary, do not show signals from EPS. These signals are very weak in non-induced cultures of HH103 *nolR* (*nolR*-). In these cases, ¹H-NMR spectra present mainly signals from mannan and KPS, indicating that the amounts of EPS have been drastically reduced.

Thus, NMR analyses confirmed that genistein reduces *S. fredii* HH103 production of EPS only when a functional copy of *nodD1* is present, and that the absence of NolR also provokes a diminution of the amount of EPS produced. Altogether, our results indicate that in HH103 the production of EPS is regulated in an opposite manner to that of Nod factors and Nops (Nodulation Outer Proteins): it is repressed by NodD1 and flavonoids, which are required for the expression of genes involved in Nod factors and Nops production, but enhanced by the regulatory protein NolR, which in turns represses the expression of *nod* and *nop* genes [6].

Genistein promotes a reduction of the expression of *exoK* and *exoY2* in *S. fredii* HH103 stationary phase cultures

The observed genistein-mediated repression of EPS production by *S. fredii* HH103 prompted us to investigate whether the presence of this flavonoid may have an effect on the expression of genes related to EPS production in this strain. Very recently, we have carried out a transcriptomic analysis of the effect of genistein on global gene expression in *S. fredii* HH103 [data are available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA313151>]. These studies, which were carried out upon a 24 h genistein treatment (early-stationary phase), did not revealed significant changes in the expression level of *exo* and *exs* genes ($|\text{fold changes}| \leq 1.6$), which are those involved in the production of EPS [12, 17].

Since *S. fredii* HH103 production of EPS is only evident in late-stationary phase, we decided to investigate the level of expression of several *exo* genes upon 96 hours of genistein treatment. The organization of the *exo* and *exs* genes of *S. fredii* HH103, which are clustered in a region of the largest plasmid (pSfHH103e) has been recently described [12, 17]. For our studies, we selected the *exoA*, *exoY2*, and *exoK* genes. Although biochemical studies of the enzymatic activities of the products encoded by these genes have not been carried out in *S. fredii* HH103, their high level of identity with the corresponding *S. meliloti* proteins (whose activities have been established, revised in [11]) clearly suggest that they most probably have the same role. Thus, ExoA would be involved in the addition of the first glucose residue to the lipid-galactose structure of the nascent EPS repeating unit, ExoY could participate in the addition of the first sugar to the lipid carrier, and ExoK could act as a glucanase involved in the cleavage of high- (HMW) to low-molecular-weight form of EPS.

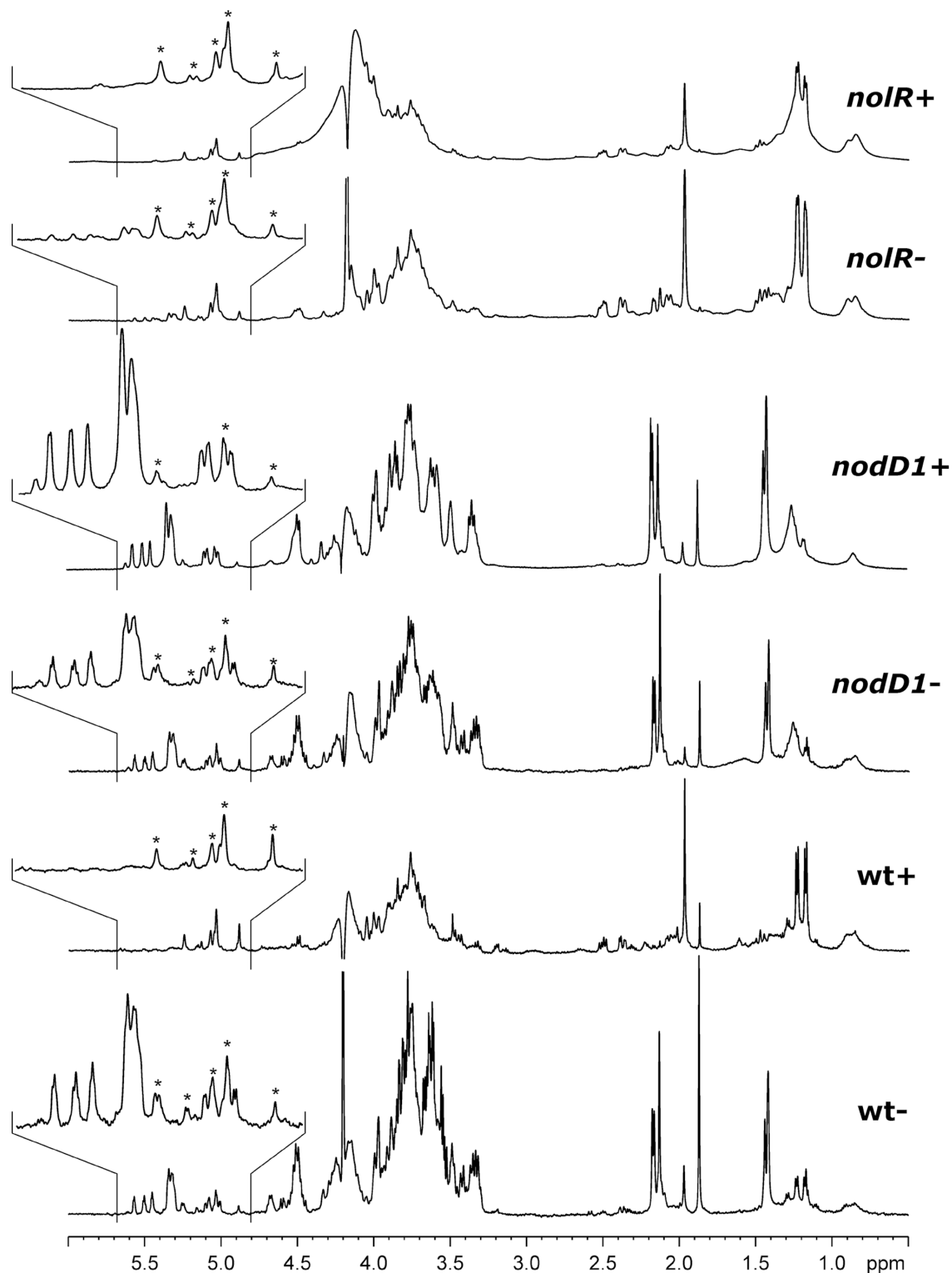


Fig 4. ^1H -NMR (500.20 MHz, 353 K) of the polysaccharides isolated from YMB culture supernatants of *S. fredii* HH103 (wt) and its *nodD1* and *nolR* derivatives grown in the absence (-) or presence of genistein (+). Peaks marked with asterisks correspond to a mannan present in yeast extract, one of the components of YMB medium.

doi:10.1371/journal.pone.0160499.g004

For the analysis of *exo* gene expression, quantitative RT-PCR (qPCR) were done by using cDNA from early (24 hours) or late (96 hours) stationary phase cultures of *S. fredii* HH103 and its *nodD1* and *nolR* derivatives grown in the presence or absence of genistein (Fig 5). In addition to *exoA*, *exoK* and *exoY2*, the *nodA* gene was also studied as a control of a gene induced by NodD1 and flavonoids and repressed by NolR. As expected, the expression of *nodA* was strongly induced by genistein when a functional NodD1 protein was present (wild-type), being this effect enhanced by the absence of NolR (*nolR* mutant background). After 24 hours of growth, the levels of expression of *exoA*, *exoK* and *exoY2* in the *nodD1* and *nolR* mutant backgrounds were not different from those of the wild-type strain, both in the absence or presence of genistein. Upon 96-hours of genistein treatment, the expression of *exoA* was neither affected by the presence of flavonoids in the three strains analyzed. In contrast, both *exoK* and *exoY2* showed reduced expression when both NodD1 and genistein were present (induced cultures of the wild-type and *nolR* mutant strains). This effect was stronger in the case of *exoY2*, whose expression level was 5-fold and 10-fold reduced in HH103 and in the *nolR* mutant background respectively. In the case of the *nolR* mutant, this reduction in the expression level of *exoY2* was observed both in the presence and absence of genistein.

Discussion

The rhizobia-legume nitrogen-fixing symbiosis is based on the interchange of signals between both symbionts [2–4]. It is well established that flavonoids exuded by legume roots interact

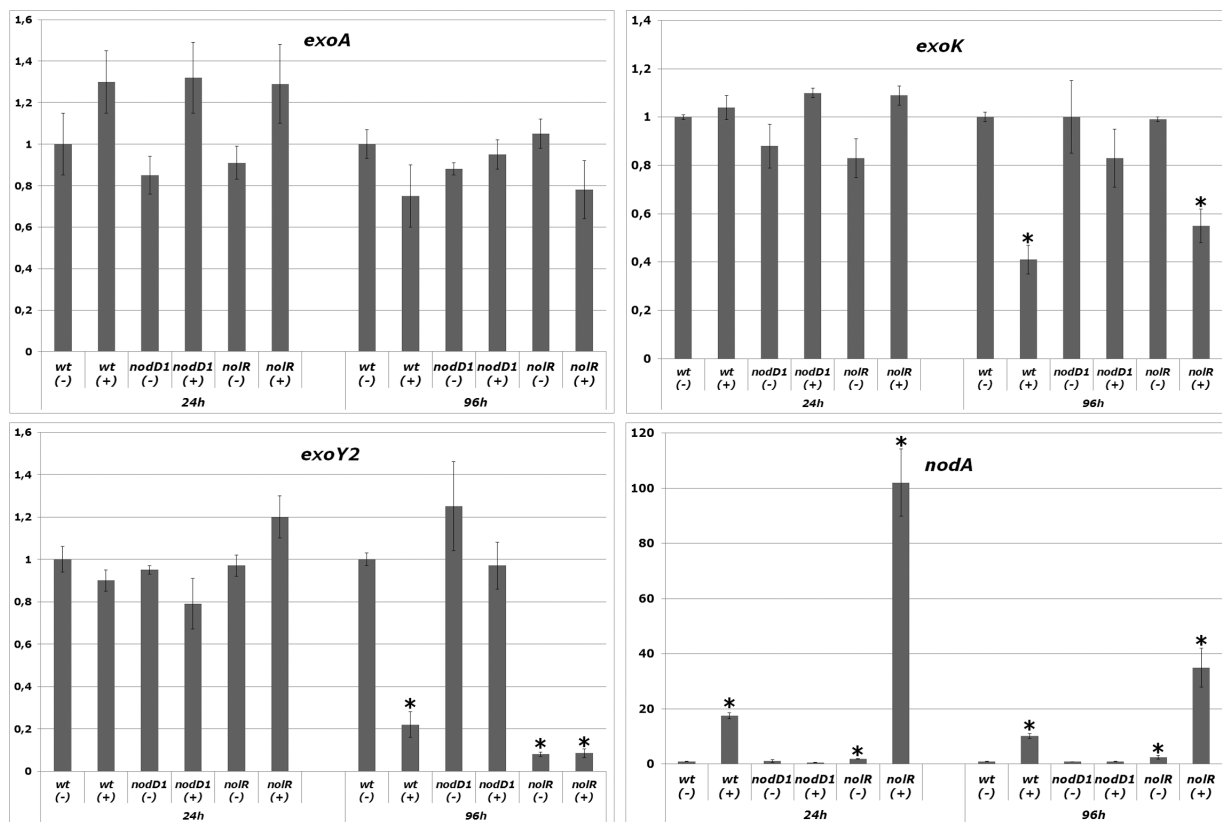


Fig 5. qRT-PCR analysis of the effect of genistein in the expression level of *exoA*, *exoK* and *exoY2* expression in *S. fredii* HH103 and its *nodD1* and *nolR* mutant derivatives in early (24 h) and late (96 h) stationary phase cultures. (-) and (+) denote the absence and presence of genistein respectively. The presence of an asterisk denotes a significant difference at the 1% level with respect to the expression level in the wild type strain grown in the absence of genistein.

doi:10.1371/journal.pone.0160499.g005

with the bacterial NodD protein inducing the expression of *nod* genes, which are responsible for the production and secretion of bacterial Nod factors. These molecular signals, in turns, elicit root hair curling and the formation of nodule primordia and are also required for infection thread formation. In some rhizobia, including *S. fredii* strains, flavonoids and NodD also induce the expression of *ttsI*, which codes for the transcriptional activator of a symbiotic type III secretion system responsible for the delivery of bacterial effector proteins into host plant cells (revised in [8]).

In *S. fredii* NGR234, flavonoids are known to also influence surface polysaccharides production. Thus, the presence of apigenin (an effective *nod* gene inducer for this strain) reduces the amount of K-antigen capsular polysaccharide produced in a process mediated by *nodD1* and *y4gM* [15] and leads to the production of a rhamnose-rich LPS through the induction of the *fixF*, *rgpF* and *wbgA* genes [16]. None of these changes takes place in *S. fredii* HH103, since *y4gM*, *fixF*, *rgpF*, and *wbgA* are not present in this strain [17].

In this work, we report that *nod* gene inducing flavonoids such as genistein reduces HH103 EPS production in a NodD1-dependent manner. To our knowledge, this is the first time that this mechanism of EPS repression is reported in rhizobia. Previous works showed that in *S. fredii* USDA193, genistein provoked changes in EPS production [18], but these changes were structural (lower average molecular mass and reduced uronic acids contents compared to control) and, although they were pSym-dependent, it has not been studied whether they were mediated by NodD proteins. In *S. fredii* USDA191 the presence of extra copies of *nodD2* led to rough colony morphology whereas extra copies of *nodD1* only reduced very slightly production of EPS in this strain [38, 39]. In addition these changes did not depend on the presence of flavonoids. In *S. fredii* HH103, the absence of *nodD1* but not that of *nodD2* led to a mucoid phenotype in the presence of flavonoids, indicating that the repressor effect of flavonoids in this strain is mediated by NodD1. However, the presence of plasmid pMUS746 in the wild-type strain also reduced its mucoidy in the presence of flavonoids, indicating that, when over-expressed, NodD2 is also able to repress EPS production in HH103. The recent sequencing of the *S. fredii* HH103 genome has revealed the presence of 15 putative *nod* boxes [17], but none of them is located upstream of genes directly involved in the biosynthesis of EPS (*exo* and *exs* genes). Therefore, the effect of NodD1 and genistein on *S. fredii* HH103 EPS production most probably is mediated by other regulatory proteins which remain to be identified.

In contrast to the results presented in this work, in both *S. meliloti* Rm1021 and *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 24.2, the presence of flavonoids has been shown to enhance EPS production [34, 40]. In Rm1021 this effect is mediated by the transcriptional regulator SyrM, which is connected to the *nod* regulon through NodD3 and that stimulates EPS production through SyrA [41, 42]. In *S. fredii* strains *syrM* is present, but both *nodD3* and *syrA* are missing [17, 43]. *R. leguminosarum* bv. *trifolii* lacks a copy of *syrM*, and in strain 24.2 the effect of flavonoids contained in clover root exudates on EPS production is exerted through the RosR transcriptional regulator [40]. In *S. fredii* HH103 there are two orthologues of RosR, called MucR1 and MucR2 [17, 43]. We are currently analyzing the role of the *S. fredii* HH103 *syrM*, *mucR1*, and *mucR2* genes of the effect of flavonoids on EPS production in this strain. Our preliminary results show that HH103 *mucR1* is an activator of EPS production, which is in agreement with recent results obtained for another *S. fredii* strain, CCBAU45436 [44], but it is not connected with the effect exerted by flavonoids. With respect to *S. fredii* HH103 *syrM*, most probably transcription of this gene is dependent on *nod* box 19 and activated by NodD1 and genistein [17], what would make this gene a good candidate for EPS regulation. Another HH103 gene that could be involved in EPS regulation is pSfHH103d_161 [17], whose expression is most probably driven by *nod* box 10. This gene codes for a putative protein that is 58% identical to *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* PsiB, an EPS repressor which has not been studied in other

rhizobia [45]. Further research is required to elucidate whether *syrM* and/or pSfHH103d_161 could be involved in the genistein induced repression of EPS production. In any case, results presented in this paper as well as previous results of our group [6] demonstrate that this effect is exerted through the *nod* regulon and that it involves NodD1 and NolR as a repressor and an activator respectively of EPS production, indicating that in *S. fredii* HH103 EPS is regulated in just the opposite way that Nod factors and type 3 secreted effectors, which are induced by NodD1 and flavonoids and repressed by NolR [6, 21, 25]. Regardless what other genes participate in this regulatory network, the presence of genistein and/or the lack of NolR led to a significant decrease of the expression of the HH103 *exoK* and *exoY2* genes as demonstrated in this work by quantitative RT-PCR. Our results are in agreement with previous observations carried out in *S. meliloti* and *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, in which modulation of EPS production is achieved by regulating the expression of a small number of *exo/pss* genes [46, 47]. Remarkably, in the case of *S. meliloti* two of these genes are *exoK* and *exoY* [46].

Another interesting finding found in this study is the fact that the *nodA* mutant derivative of *S. fredii* HH103, when compared to the parental strain, showed alterations in its appearance when grown on YMA plates as well as in the amount of glucose equivalents found in the extra-cellular milieu in the presence of genistein. Elucidating the nature of these alterations is an issue that we will address in the next future. Remarkably, inactivation of *nodA*, which results in inability to produce Nod factors, does not alter the HH103 ability to attach onto plastic surfaces. In contrast, in *S. meliloti* Nod factors are required for the establishment of the three-dimensional architecture of biofilms [48], which suggests that different sinorhizobial strains might have developed different strategies for biofilm formation.

EPS plays an essential role in nodule invasion in symbiosis with legumes forming indeterminate nodules, such as the interactions *S. meliloti*-*Medicago* or *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*-*Trifolium* [11 and references therein]. On the other hand, although traditionally EPS has been considered not essential in symbiosis forming determinate nodules, recent works show that production of altered forms of this polysaccharide can lead to impairments in the interactions *Bradyrhizobium japonicum* USDA110-soybean and *Mesorhizobium loti*-*Lotus japonicus* [49, 50]. These results can be explained by the recent discovery of a *Lotus* LysM receptor which senses the presence of EPS and which is able to block root infection when non-appropriate forms of this polysaccharide are detected [51].

So, an open question is why *S. fredii* HH103 EPS production is repressed by flavonoids present in legume root exudates? *S. fredii* HH103 has a broad host range of nodulation [52], which allows studying the role of its molecular signals with different host legumes. Regarding surface polysaccharides, only CG has been proven to be essential for nodulating all its host plants tested so far [53]. In previous works, we have analyzed the symbiotic performance of an EPS deficient derivative of this strain due to an *exoA* mutation [10, 13, 14]. This mutant was able to induce nitrogen fixing nodules in the different legumes analyzed regardless they formed indeterminate (*Glycyrrhiza uralensis* and *Cajanus cajan*) or determinate (*Glycyne max* and *Vigna unguiculata*) nodules, suggesting a low importance for this polysaccharide in HH103 symbiotic ability. In fact, with soybean (*G. max*) the HH103 *exoA* derivative not only showed a slightly increased symbiotic performance but it was even more competitive for nodulating this plant [12, 13], which suggest that, at least with this legume, the presence of EPS can have a slight but detrimental effect on symbiosis. However, this would not be always the case, since opposite results were found with cowpea (*V. unguiculata*), in which the *exoA* derivative of *S. fredii* HH103 showed slightly decreased symbiotic performance and lower competitiveness ability than the parental strain [12, 13].

In summary, we show that in *S. fredii* HH103 *nod* gene inducing flavonoids, in addition to promote the production of Nod factors and the delivery of type 3 secreted effectors, modify

bacterial surface by repressing EPS production. This change is different to those described in other rhizobia such as *S. fredii* NGR234, in which flavonoids repress KPS and induce a novel type of LPS, or *S. meliloti* and *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, which increase EPS production upon treatment with flavonoids. Thus, this study represents a new example of that mechanisms found in model bacteria are not always present in other rhizobial strains.

Supporting Information

S1 Table. Primers used in quantitative RT-PCR (qPCR) experiments.
(DOC)

Acknowledgments

We thank the Biology and NMR Services of the Centro de Investigación, Tecnología e Innovación (CITIUS) of the University of Seville. We would also like to thank to the two anonymous referees that have reviewed this work since their suggestions have undoubtedly contributed to improve its quality.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JMV SAJ JERS MARC.

Performed the experiments: SAJ PNG PSM JCCR SJ LCB.

Analyzed the data: SAJ JMV JCCR PSM MARC.

Contributed reagents/materials/analysis tools: JMV JERS MARC.

Wrote the paper: JMV.

References

1. Suzuki T, Yoro E, Kawaguchi M. Leguminous plants: inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2015; 316: 111–158. doi: [10.1016/bs.ircmb.2015.01.004](https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.01.004) PMID: [25805123](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25805123/)
2. Downie JA. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol Rev*. 2010; 34: 150–170. doi: [10.1111/j.1574-6976.2009.00205.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00205.x) PMID: [20070373](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20070373/)
3. Janczarek M, Rachwał K, Marzec A, Grządziel J, Palusińska-Szys M. Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume–rhizobium interactions. *Appl Soil Ecol*. 2015; 85: 94–113.
4. López-Baena FJ, Ruiz-Sainz JE, Rodríguez-Carvajal MA, Vinardell JM. Bacterial molecular signals in the *Sinorhizobium fredii*-soybean symbiosis. *Int J Mol Sci*. 2016; 17:755.
5. Kondorosi E, Gyuris J, Schmidt J, John M, Duda E, Hoffmann B, et al. Positive and negative control of nod gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation. *EMBO J*. 1989; 8: 1331–1340. PMID: [16453883](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16453883/)
6. Vinardell JM, Ollero FJ, Hidalgo A, López-Baena FJ, Medina C, Ivanov-Vangelov K, et al. NodR regulates diverse symbiotic signals of *Sinorhizobium fredii* HH103. *Mol Plant-Microbe Interact* 2004; 17: 676–685. PMID: [15195950](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15195950/)
7. Oldroyd GE. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol*. 2013; 11: 252–263. doi: [10.1038/nrmicro2990](https://doi.org/10.1038/nrmicro2990) PMID: [23493145](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23493145/)
8. Staehelin C, Krishnan HB. Nodulation outer proteins: double-edged swords of symbiotic rhizobia. *Biochem J*. 2015; 470: 263–274. doi: [10.1042/BJ20150518](https://doi.org/10.1042/BJ20150518) PMID: [26341483](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26341483/)
9. Fraysse N, Couderc F, Poinot V. Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Eur J Biochem*. 2003; 270: 1365–1380. PMID: [12653992](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12653992/)

10. Margaret-Oliver I, Lei W, Parada M, Rodríguez-Carvajal MA, Crespo-Rivas JC, Hidalgo A, et al. *Sinorhizobium fredii* HH103 does not strictly require KPS and/or EPS to nodulate *Glycyrrhiza uralensis*, an indeterminate nodule-forming legume. Arch Microbiol. 2012; 194: 87–102. doi: [10.1007/s00203-011-0729-2](https://doi.org/10.1007/s00203-011-0729-2) PMID: [21761170](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21761170/)
11. Janczarek M. Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. Int J Mol Sci. 2011; 12: 7898–7933. doi: [10.3390/ijms12117898](https://doi.org/10.3390/ijms12117898) PMID: [22174640](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22174640/)
12. Rodríguez-Navarro DN, Rodríguez-Carvajal MA, Acosta-Jurado S, Soto MJ, Margaret I, Crespo-Rivas JC, et al. Structure and biological roles of *Sinorhizobium fredii* HH103 exopolysaccharide. PLoS One. 2014; 9: e115391. doi: [10.1371/journal.pone.0115391](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115391) PMID: [25521500](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25521500/)
13. Parada M, Vinardell JM, Ollero FJ, Hidalgo A, Gutiérrez R, Buendía-Clavería AM, et al. *Sinorhizobium fredii* HH103 mutants affected in capsular polysaccharide (KPS) are impaired for nodulation with soybean and *Cajanus cajan*. Mol Plant-Microbe Interact. 2006; 19: 43–52. PMID: [16404952](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16404952/)
14. Hidalgo A, Margaret I, Crespo-Rivas JC, Parada M, Murdoch PS, López A, et al. The *rkpU* gene of *Sinorhizobium fredii* HH103 is required for bacterial K-antigen polysaccharide production and for efficient nodulation with soybean but not with cowpea. Microbiology 2010; 156: 3398–3411. doi: [10.1099/mic.0.042499-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.042499-0) PMID: [20688828](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20688828/)
15. Simsek S, Ojanen-Reuhs T, Marie C, Reuhs BL. An apigenin-induced decrease in K-antigen production by *Sinorhizobium* sp. NGR234 is *y4gM*- and *nodD1*-dependent. Carbohydr Res. 2009; 344: 1947–1950. doi: [10.1016/j.carres.2009.07.006](https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.07.006) PMID: [19679303](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19679303/)
16. Ardisson S, Noel KD, Klement M, Broughton WJ, Deakin WJ. Synthesis of the flavonoid-induced lipopolysaccharide of *Rhizobium* sp. strain NGR234 requires rhamnosyl transferases encoded by genes *rgpF* and *wbgA*. Mol Plant-Microbe Interact. 2011; 24: 1513–1521. doi: [10.1094/MPMI-05-11-0143](https://doi.org/10.1094/MPMI-05-11-0143) PMID: [22066901](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22066901/)
17. Vinardell JM, Acosta-Jurado S, Zehner S, Göttfert M, Becker A, Baena I, et al. The *Sinorhizobium fredii* HH103 genome: a comparative analysis with *S. fredii* strains differing in their symbiotic behavior with soybean. Mol Plant Microbe Interact. 2015; 28: 811–824. doi: [10.1094/MPMI-12-14-0397-FI](https://doi.org/10.1094/MPMI-12-14-0397-FI) PMID: [25675256](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25675256/)
18. Dunn MF, Pueppke SG, Krishnan HB. The *nod* gene inducer genistein alters the composition and molecular mass distribution of extracellular polysaccharides produced by *Rhizobium fredii* USDA193. FEMS Microbiol Lett. 1992; 97: 107–112.
19. Madinabeitia N, Bellogín RA, Buendía-Clavería AM, Camacho M, Cubo T, Espuny MR, et al. *Sinorhizobium fredii* HH103 has a truncated *noI* gene due to a -1 frameshift mutation that is conserved among other geographically distant *S. fredii* strains. Mol Plant Microbe Interact. 2002; 15: 150–159. PMID: [11878319](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11878319/) doi: [10.1094/mpmi.2002.15.2.150](https://doi.org/10.1094/mpmi.2002.15.2.150)
20. Buendía-Clavería AM, Moussaid A, Ollero FJ, Vinardell JM, Torres A, Moreno J, et al. A *purL* mutant of *Sinorhizobium fredii* HH103 is symbiotically defective and altered in its lipopolysaccharide. Microbiol-ogy. 2003; 149: 1807–1818. PMID: [12855732](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12855732/)
21. Vinardell JM, López-Baena FJ, Hidalgo A, Ollero FJ, Bellogín R, del Rosario Espuny M, et al. The effect of FITA mutations on the symbiotic properties of *Sinorhizobium fredii* varies in a chromosomal-background dependent manner. Arch Microbiol. 2004; 181: 144–154. PMID: [14689165](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14689165/)
22. Beringer JE. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J Gen Microbiol. 1974; 84: 188–198. PMID: [4612098](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4612098/)
23. Vincent JM. Appendix III. The modified Fåhræus slide technique. In Vincent JM, editor. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Oxford, UK. Blackwell Scientific, 1970. pp 144–145.
24. O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol Microbiol. 1998; 28: 449–461. PMID: [9632250](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9632250/)
25. López-Baena FJ, Vinardell JM, Pérez-Montañón F, Crespo-Rivas JC, Bellogín RA, Espuny MR, et al. Regulation and symbiotic significance of nodulation outer proteins secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103. Microbiology. 2008; 154: 1825–1836. doi: [10.1099/mic.0.2007/016337-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/016337-0) PMID: [18524937](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18524937/)
26. Becker A, Schmidt M, Jäger W, Pühler A. New gentamicin resistance and *lacZ* promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. Gene. 1995; 162: 37–39. PMID: [7557413](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7557413/) doi: [10.1016/0378-1119\(95\)00313-u](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00313-u)
27. Keyser HH, Bohlool BB, Hu TS, Weber DF. Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybean. Science. 1982; 215: 1631–1632 PMID: [17788491](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17788491/)
28. Trinick MJ. Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* sp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. J Appl Bacteriol. 1980; 49: 39–53

29. Meade HM, Signer ER. Genetic mapping of *Rhizobium meliloti*. Proc Natl Acad Sci USA. 1977; 74: 2076–2078. PMID: [266730](#)
30. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
31. Simon R. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the *in vivo* constructed Tn5-Mob transposon. Mol Gen Genet. 1984; 196: 413–420. PMID: [6094969](#)
32. Abarca-Grau AM, Burbank LP, de Paz HD, Crespo-Rivas JC, Marco-Noales E, López MM, et al. Role for *Rhizobium rhizogenes* K84 cell envelope polysaccharides in surface interactions. Appl Environ Microbiol. 2012; 78: 1644–1651. doi: [10.1128/AEM.07117-11](#) PMID: [22210213](#)
33. Gottlieb HE, Kotlyar V, Nudelman A. NMR Chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. J Org Chem. 1997; 62: 7512–7515. PMID: [11671879](#)
34. Dusha I, Olah B, Szegletes Z, Erdei L, Kondorosi A. *syrM* is involved in the determination of the amount and ratio of the two forms of the acidic exopolysaccharide EPS I in *Rhizobium meliloti*. Mol Plant Microbe Interact. 1999; 12: 755–765.
35. Peters NK, Frost JW, Long SR. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Science. 1986; 233: 977–980. PMID: [3738520](#)
36. Machado D, Pueppke SG, Vinardell J.M, Ruiz-Sainz JE, Krishnan HB. Expression of *nodD1* and *nodD2* in *Sinorhizobium fredii*, a nitrogen-fixing symbiont of soybean and other legumes. Mol Plant Microbe Interact. 1998; 11: 375–382.
37. Gil-Serrano AM, Rodríguez-Carvajal MA, Tejero-Mateo P, Espartero JL, Menendez M, Corzo J, et al. Structural determination of a 5-acetamido-3,5,7,9-tetradecyloxy-7-(3-hydroxybutyramido)-L-glycero-L-manno-nonulosonic acid-containing homopolysaccharide isolated from *Sinorhizobium fredii* HH103. Biochem J. 1999; 342: 527–535. PMID: [10477263](#)
38. Appelbaum ER, Thompson DV, Idler K, Chartrain N. *Bradyrhizobium japonicum* USDA191 has two *nodD* genes that differ in primary structure and function. J Bacteriol. 1988; 170: 12–20. PMID: [2826389](#)
39. Machado D, Krishnan HB. *nodD* alleles of *Sinorhizobium fredii* USDA 191 differentially influence soybean nodulation, *nodC* expression, and production of exopolysaccharides. Curr Microbiol. 2003; 47: 134–137. PMID: [14506861](#)
40. Janczarek M, Skorupska A. Modulation of *rosR* expression and exopolysaccharide production in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* by phosphate and clover root exudates. Int. J. Mol. Sci. 2011; 12: 4132–4155. doi: [10.3390/ijms12064132](#) PMID: [21747729](#)
41. Barnett MJ, Swanson JA, Long SR. Multiple genetic controls on *Rhizobium meliloti* *syrA*, a regulator of exopolysaccharide abundance. Genetics. 1998; 148: 19–32. PMID: [9475718](#)
42. Barnett MJ, Long SR. The *Sinorhizobium meliloti* *SyrM* regulon: effects on global gene expression are mediated by *syrA* and *nodD3*. J Bacteriol. 2015; 197: 1792–1806. doi: [10.1128/JB.02626-14](#) PMID: [25777671](#)
43. Weidner S, Becker A, Bonilla I, Jaenicke S, Lloret J, Margaret I, et al. Genome sequence of the soybean symbiont *Sinorhizobium fredii* HH103. J Bacteriol. 2012; 194: 1617–1618. doi: [10.1128/JB.06729-11](#) PMID: [22374952](#)
44. Jiao J, Wu LJ, Zhang B, Hu Y, Li Y, Zhang XX, et al. MucR Is Required for Transcriptional Activation of Conserved Ion Transporters to Support Nitrogen Fixation of *Sinorhizobium fredii* in Soybean Nodules. Mol Plant Microbe Interact. 2016; 29: 352–361. doi: [10.1094/MPMI-01-16-0019-R](#) PMID: [26883490](#)
45. Mimmack ML, Borthakur D, Jones MA, Downie JA, Johnston AW. The *psi* operon of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*: identification of two genes whose products are located at the bacterial cell surface. Microbiology. 1994; 140: 1223–1229. PMID: [7517767](#)
46. Keller M, Roxlau A, Wenig WM, Schmidt M, Quandt J, Niehaus K, et al. Molecular analysis of the *Rhizobium meliloti* *mucR* gene regulating the biosynthesis of the exopolysaccharides succinoglycan and galactoglucan. Mol Plant-Microbe Interact. 1995; 8: 267–275. PMID: [7756693](#)
47. Rachwał K, Matczyńska E, Janczarek M. Transcriptome profiling of a *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosR* mutant reveals the role of the transcriptional regulator RosR in motility, synthesis of cell-surface components, and other cellular processes. BMC Genomics. 2015; 16: 1111. doi: [10.1186/s12864-015-2332-4](#) PMID: [26715155](#)
48. Fujishige NA, Lum MR, De Hoff PL, Whitelegge JP, Faull KF, Hirsch AM. *Rhizobium* common nod genes are required for biofilm formation. Mol Microbiol. 2008; 67: 504–515. PMID: [18086203](#)
49. Quelas JI, Mongiardini EJ, Casabuono A, López-García SL, Althabegoiti MJ, Covelli JM, et al. Lack of galactose or galacturonic acid in *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 exopolysaccharide leads to different symbiotic responses in soybean. Mol Plant Microbe Interact. 2010; 23: 1592–1604. doi: [10.1094/MPMI-05-10-0122](#) PMID: [20636103](#)

50. Kelly SJ, Muszyński A, Kawaharada Y, Hubber AM, Sullivan JT, Sandal N, et al. Conditional requirement for exopolysaccharide in the *Mesorhizobium-Lotus* symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact*. 2013; 26: 319–329. doi: [10.1094/MPMI-09-12-0227-R](https://doi.org/10.1094/MPMI-09-12-0227-R) PMID: [23134480](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23134480/)
51. Kawaharada Y, Kelly S, Nielsen MW, Hjuler CT, Gysel K, Muszyński A, et al. Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature* 2015; 523: 308–312. doi: [10.1038/nature14611](https://doi.org/10.1038/nature14611) PMID: [26153863](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26153863/)
52. Margaret I, Becker A, Blom J, Bonilla I, Goesmann A, Göttfert M, et al. Symbiotic properties and first analyses of the genomic sequence of the fast growing model strain *Sinorhizobium fredii* HH103 nodulating soybean. *J. Biotechnol*. 2011; 155: 11–19. doi: [10.1016/j.jbiotec.2011.03.016](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.03.016) PMID: [21458507](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21458507/)
53. Crespo-Rivas JC, Margaret I, Hidalgo A, Buendía-Clavería AM, Ollero FJ, López-Baena FJ, et al. *Sinorhizobium fredii* HH103 *cgs* mutants are unable to nodulate determinate- and indeterminate nodule-forming legumes and overproduce an altered EPS. *Mol Plant Microbe Interact*. 2009; 22: 575–588. doi: [10.1094/MPMI-22-5-0575](https://doi.org/10.1094/MPMI-22-5-0575) PMID: [19348575](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19348575/)

Capítulo IV:

Acosta-Jurado, S., Alias-Villegas, C., Navarro-Gómez, P., Zehner, S., Murdoch, P.D., Rodríguez-Carvajal, M.A., Soto, M.J., Ollero F.J., Ruiz-Sainz, J.E., Göttfert, M., Vinardell, J.M. 2016c. The *Sinorhizobium fredii* HH103 MucR1 global regulator is connected with the *nod* regulon and is required for efficient symbiosis with *Lotus burtii* and *Glycine max* cv. Williams. Mol Plant Microbe Interact. 29:700-712.

The *Sinorhizobium fredii* HH103 MucR1 Global Regulator Is Connected With the *nod* Regulon and Is Required for Efficient Symbiosis With *Lotus burtii* and *Glycine max* cv. Williams

Sebastián Acosta-Jurado,¹ Cynthia Alias-Villegas,¹ Pilar Navarro-Gómez,¹ Susanne Zehner,² Piedad del Socorro Murdoch,³ Miguel A. Rodríguez-Carvajal,⁴ María J. Soto,⁵ Francisco-Javier Ollero,¹ José E. Ruiz-Sainz,¹ Michael Göttfert,² and José-María Vinardell¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avda. Reina Mercedes 6, C.P. 41012, Sevilla, Spain, ²Technische Universität Dresden, Institut für Genetik, Helmholtzstrasse 10, 01062 Dresden, Germany, ³Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, ⁴Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Calle Profesor García González 1, C. P. 41012, Sevilla, Spain, and ⁵Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18008 Granada, Spain

Accepted 27 July 2016.

Sinorhizobium fredii HH103 is a rhizobial strain showing a broad host range of nodulation. In addition to the induction of bacterial nodulation genes, transition from a free-living to a symbiotic state requires complex genetic expression changes with the participation of global regulators. We have analyzed the role of the zinc-finger transcriptional regulator MucR1 from *S. fredii* HH103 under both free-living conditions and symbiosis with two HH103 host plants, *Glycine max* and *Lotus burtii*. Inactivation of HH103 *mucR1* led to a severe decrease in exopolysaccharide (EPS) biosynthesis but enhanced production of external cyclic glucans (CG). This mutant also showed increased cell aggregation capacity as well as a drastic reduction in nitrogen-fixation capacity with *G. max* and *L. burtii*. However, in these two legumes, the number of nodules induced by the *mucR1* mutant was significantly increased and decreased, respectively, with respect to the wild-type strain, indicating that MucR1 can differently affect nodulation depending on the host plant. RNA-Seq analysis carried out in the absence and the presence of flavonoids showed that MucR1 controls the expression of hundreds of genes (including some related to EPS production and CG transport), some of them being related to the *nod* regulon.

Legumes and a group of soil proteobacteria collectively called rhizobia (Peix et al. 2015) are able to establish a symbiotic interaction in which the microsymbiont infects plant

roots and multiplies inside a new plant organ, the nodule, in which they differentiate into nitrogen-fixing bacteroids (Oldroyd 2013; Suzuki and Kawaguchi 2014). This symbiosis is driven by a complex interchange of molecular signals between both symbionts, and therefore, the participation of diverse regulatory elements is required for a successful interaction (Downie 2010; Janczarek et al. 2015; López-Baena et al. 2016). On the bacterial side, the LysR-type transcriptional regulator NodD is activated by flavonoids exuded by the plant and induces the expression of bacterial genes related to the production of nodulation factors. These molecular signals are perceived by the plant, allowing root infection and triggering the nodule developmental program. In some rhizobia, NodD and plant flavonoids also induce the formation of a symbiotic type III secretion system (T3SS) able to inject effector proteins into plant cells in order to reduce plant defense responses (López-Baena et al. 2016). Diverse bacterial surface polysaccharides also participate in the symbiosis, acting as molecular signals required for one or both infection progression or diminishing defense responses. In addition to NodD (which can be present in different copies having different roles), other transcriptional regulators, such as TtsI (responsible for expression of the symbiotic T3SS), SyrM, and NolR, are necessary for the transition from a free-living to a symbiotically competent state and, therefore, for a successful interaction. In fact, NolR is a global regulatory protein, which, in *S. meliloti*, is required not only for the optimization of nodulation but also for bacterial growth and survival and conjugative transfer of a plasmid (Chen et al. 2005).

The RosR/MucR protein family is composed of transcriptional regulators that contain a Cys₂His₂ type zinc-finger motif (Keller et al. 1995). They are widely distributed in proteobacteria, in which they regulate very diverse processes, such as cell-cycle transition from S-phase to G1 in *Caulobacter* (Fumeaux et al. 2014), alginate production in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* (Wang et al. 2015), or expression of the plant oncogene *ipt* in *Agrobacterium* spp. (Chou et al. 1998). In the animal pathogen *Brucella melitensis*, genes encoding a type IV secretion or a quorum-sensing system are downregulated in a *mucR* deletion mutant (Dong et al. 2013). In *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and *Sinorhizobium meliloti*, RosR/MucR were first described as positive regulators of exopolysaccharide (EPS) biosynthesis (Janczarek and Skorupska 2007; Keller et al.

RNA-Seq data have been deposited in the Sequence Read Archive of the National Center for Biotechnology Information (BioProject database) under the BioProjects ID PRJNA313151 and PRJNA324263.

Current address for S. Zehner: Abteilung Mikrobiologie, Fachbereich Biologie, Technische Universität Kaiserslautern, Erwin Schrödinger Straße 56, 67663 Kaiserslautern, Germany.

Corresponding author: J. M. Vinardell; Telephone: +1 34-954554330; Fax: +1 34-954557830; E-mail: jvinar@us.es

*The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates that eight supplementary figures, one supplementary table, six supplementary datasets, and supplementary methods are published online.

1995). In addition, in the case of *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, inactivation of *rosR* led to ineffective symbiosis with *Trifolium* spp. More recent works showed that the RosR protein of *R. leguminosarum* bv. *trifolii* regulates different processes, such as the synthesis of cell-surface components (including polysaccharides), motility, and bacterial metabolism (Janczarek et al. 2010; Rachwał et al. 2015). Therefore, RosR plays an important role in bacterial adaptation to environmental conditions. During the preparation of this manuscript, Jiao et al. (2016) reported that *Sinorhizobium fredii* CCBAU45436 MucR1 is essential for supporting nitrogen fixation of this strain in *Glycine max* JD17 nodules. In that work, the authors also provided a transcriptomic analysis showing that MucR1 positively regulates the expression of different inorganic ion transporters required for effective nitrogen fixation in CCBAU45436 bacteroids.

In this work, we have studied the regulatory roles of MucR1 in *S. fredii* HH103, a broad host range rhizobial strain able to nodulate American and Asiatic varieties of soybean (López-Baena et al. 2016; Margaret et al. 2011; Vinardell et al. 2015). Inactivation of HH103 *mucR1* decreased EPS and increased external cyclic glucans (CG) production, enhanced biofilm formation at the liquid-air interface (pellicle) and autoaggregation, and led to a severe impairment in symbiosis with *Lotus burtii* and *Glycine max* cv. Williams. Although, in both cases, host plants inoculated with the *mucR1* mutant showed symptoms of nitrogen starvation, the number of nodules formed were significantly decreased with *Lotus burtii* and increased with soybean in comparison with plants inoculated with the wild-type strain. Finally, transcriptomic analysis showed that, in addition to controlling genes involved in EPS and CG production, motility, and chemotaxis, HH103 MucR1 also affects genes included in the *nod* regulon, which could account for the symbiotic phenotype of HH103 *mucR1* with *L. burtii*.

RESULTS AND DISCUSSION

Sinorhizobium fredii HH103 harbors two copies of *mucR*.

Sequence analysis of the genome of *S. fredii* HH103 revealed the presence of two copies of the *mucR* gene (Vinardell et al. 2015; Weidner et al. 2012). One of them, *mucR1* (SFHH103_00694), is located on the chromosome and encodes a 143-amino acid protein that is 99 and 80% identical to the MucR and RosR transcriptional regulators from *S. meliloti* 1021 and *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, respectively. The second copy, *mucR2* (psfHH103d_392), is located on the symbiotic plasmid close to the *nodD1* gene and encodes a protein of 142 residues that is 81% identical to HH103 MucR1. The MucR1 and MucR2 proteins of *S. fredii* HH103 are 100% identical to the corresponding proteins recently described in *S. fredii* CCBAU45436 (Jiao et al. 2016). In strain CCBAU45436, MucR2 is not functionally equivalent to MucR1, due to a frameshift mutation.

In order to analyze the roles of HH103 *mucR1* and *mucR2* in free-living conditions and in symbiosis, the following mutants were constructed as described in Supplementary Methods: SVQ706 (Δ *mucR1*), SVQ719 (*mucR2::lacZAp-Gm^R*), SVQ720 (Δ *mucR1 mucR2::lacZAp-Gm^R*), and SVQ721 (*mucR1::lacZAp-Gm^R*). A complemented version of SVQ706, called SVQ706C, was constructed by introduction of a wild-type version of the *mucR1* gene in *cis*.

S. fredii HH103 MucR1 is a positive regulator of EPS production.

The MucR/RosR proteins have been described to be involved in regulation of polysaccharide production in different rhizobia (Janczarek and Skorupska 2011). For this reason, the production of EPS by the different *mucR* mutants of HH103 was analyzed on yeast extract-mannitol agar (YMA) plates. In *S. fredii* HH103, the presence of flavonoids has a negative effect on EPS production (Acosta-Jurado et al. 2016; Vinardell et al. 2004a). For this reason, production of EPS was investigated both in the absence and in the presence of genistein, an effective *nod* gene inducer for HH103 (Vinardell et al. 2004b). Regardless of the presence of genistein, all the mutants affected in *mucR1* showed a rough appearance, suggesting a drastic reduction in EPS production (Fig. 1). The *mucR2* single mutant, instead, was undistinguishable from the wild-type strain, both in the presence or absence of flavonoids. The production of EPS by HH103 Δ *mucR1* in liquid YM medium was also quantified by the anthrone-H₂SO₄ method. These experiments showed that HH103 Δ *mucR1* produced only 17.4 ± 6.2 μ g of sugar per milliliter of supernatant in contrast to the 83.2 ± 16.8 μ g/ml produced by the parental strain HH103. The complemented *mucR1* derivative recovered smooth appearance on YMA plates (Fig. 1) as well as wild-type levels of EPS production (119.2 ± 32.5 μ g/ml). In the presence of genistein, the production of EPS was clearly reduced in the three strains (6.9 ± 0.8 , 4.7 ± 1.0 , and 6.7 ± 5.2 μ g of sugar per milliliter of supernatant for HH103, Δ *mucR1*, and the complemented version of the mutant, respectively).

Production of EPS by HH103 Δ *mucR1* was further analyzed by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. In order to compare NMR spectra from HH103 and HH103 Δ *mucR1*, residual signals from a mannan present in culture media were used as reference (Fig. 2, marked with asterisks). Mutant Δ *mucR1* presented the signals corresponding to wild-type EPS (those corresponding to the anomeric region [zoomed on the left in Figure 2] and those corresponding to acetyl and pyruvate groups), but the intensity of the signals in the mutant was very weak in comparison with those of HH103, confirming that the absence of MucR1 led to a drastic decrease in the production of this polysaccharide. Introduction of a wild-type copy of *mucR1* restored wild-type levels of EPS production. These results confirmed that MucR1 is a positive regulator of EPS production in *S. fredii* HH103, in agreement with previous results in *S. meliloti* 1021, *Rhizobium*

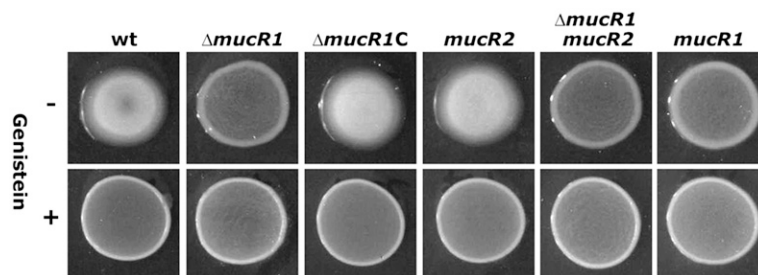


Fig. 1. Colony appearance on yeast extract-mannitol agar (YMA) plates by *Sinorhizobium fredii* HH103 Rif^R (wt) and different *mucR1* or *mucR2* derivatives in the absence (upper row) or the presence (bottom row) of genistein. The *mucR1* deletion is denoted as Δ *mucR1*, whereas mutations constructed by fusions to the *lacZAp-Gm^R* cassette are denoted as *mucR1* or *mucR2*. The complemented version of the Δ *mucR1* mutants is indicated as Δ *mucR1C*.

leguminosarum bv. *trifolii* Rt24.2, and *S. fredii* CCBAU45436 (Janczarek 2011; Jiao et al. 2016). Our results also show that HH103 MucR2 has no role in EPS production, which is in coherence with the fact that this protein is 100% identical to the nonfunctional MucR2 protein of *S. fredii* CCBAU45436 (Jiao et al. 2016).

Inactivation of *S. fredii mucR1* affects biofilm formation ability and autoaggregation.

As inactivation of *mucR1* led to a dramatic decrease of EPS production by HH103, we investigated whether it could also affect the ability of this strain to form biofilms. For this purpose, HH103, its Δ *mucR1* mutant, and the complemented derivative of this mutant were grown in MGM medium (O'Toole and Kolter 1998) in polystyrene microtiter plates. Formation of biofilms was investigated both in the absence and in the presence of genistein (Supplementary Fig. S1). The biomass of the biofilm was measured by staining with crystal violet as described below. The amount of biofilm formed by HH103 Δ *mucR1* was significantly higher than that of the parental strain and was not affected by the presence of genistein. The same results were obtained with the *mucR1::lacZ* Δ p-Gm^R and with the double *mucR1 mucR2* mutant (data not shown). The introduction of a wild-type copy of *mucR1* in the Δ *mucR1* mutant restored normal levels of biofilm formation. The increased ability for biofilm formation exhibited by HH103 Δ *mucR1* was surprising, since, in previous works, we have shown that EPS is an important trait for biofilm formation by *S. fredii* HH103 (Acosta-Jurado et al. 2016; Rodríguez-Navarro et al. 2014). In addition, in the microtiter wells inoculated with the Δ *mucR1* mutant (especially in the cultures grown in the absence of genistein), a floating and translucent layer was observed. Thus, the increased biofilm formation capacity exhibited by HH103 Δ *mucR1* appears to correspond to the formation of an aggregate of cells in the liquid-air interface (also called pellicle) rather than to a biofilm of cells attached to the liquid-covered plastic surface of the well.

The effect of *mucR1* inactivation on biofilm formation was also investigated on glass surfaces. For this purpose, plasmid

pSKDSRED (Kelly et al. 2013), containing a constitutively expressed red fluorescent protein, was introduced by conjugation into HH103, its Δ *mucR1* derivative, and the complemented version of this mutant (Δ *mucR1C*), and the resultant strains were grown in MGM medium in glass Coplin staining jars containing glass slides (discussed below; Supplementary Fig. S2). The biofilms formed on glass slides were scored at 24 and 96 h postinoculation by epifluorescence microscopy. Three different sections of the glass slide were examined, lower, medium, and upper, located at 5, 28, and 49 mm from the bottom of the slide, respectively. Thus, the lower and medium sections were sunken into the culture medium, whereas the upper section was located at the liquid-air interface. Results, presented in Supplementary Fig. S3 and Figure 3, revealed that the Δ *mucR1* mutant showed increased attachment with respect to both HH103 and Δ *mucR1C* and that this attachment was localized mostly at the liquid medium-air interface. Thus at 24 h postinoculation, both HH103 and Δ *mucR1C* showed a dispersed pattern of attachment in the three sections scored, whereas Δ *mucR1* displayed a layer of cells attached to the upper section. At 96 h (Fig. 3), this layer of cells was also formed by HH103 and Δ *mucR1C*, but it was much more evident for Δ *mucR1*. These results confirmed that the Δ *mucR1* derivative of *S. fredii* HH103 exhibits increased capacity to form biofilms onto inert surfaces in the liquid-air interface.

We have also analyzed whether the changes promoted by *mucR1* inactivation could influence bacterial autoaggregation capacity as described below (Supplementary Fig. S4). After 96 h of growth in liquid MGM medium with continuous shaking (180 rpm), the three *mucR1* mutants tested (Δ *mucR1*, *mucR1::lacZ* Δ p-Gm^R, and the double *mucR1 mucR2* mutant) showed elevated autoaggregation capacities (90.0 ± 3.1 , 76.4 ± 4.8 , and $87.6 \pm 1.7\%$ respectively), in clear contrast to the wild type, the *mucR2::lacZ* Δ p-Gm^R, and Δ *mucR1C* strains (1.0 ± 0.7 , 1.1 ± 0.7 , and $2.7 \pm 3.0\%$, respectively). In order to check whether the decreased production of EPS exhibited by the different *mucR1* mutants of HH103 could be the reason for the increased autoaggregation capacity observed in these mutants, strain SVQ530, an *exoA::lacZ* Δ p-Gm^R EPS-defective mutant of

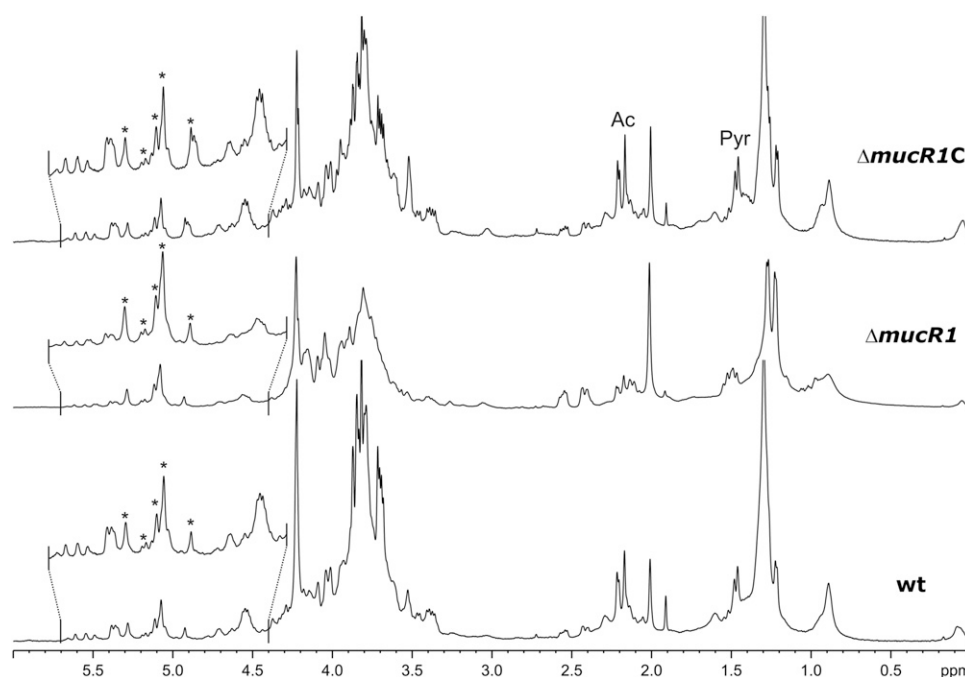


Fig. 2. Nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) (500 MHz, 353 K) spectra of exopolysaccharide (EPS) isolated from *Sinorhizobium fredii* HH103 Rif^R (marked as wt), HH103 Δ *mucR1*, and HH103 Δ *mucR1C*. Signals from acetyl (Ac) and pyruvate (Pyr) groups are indicated. Signals corresponding to the anomeric region of EPS are zoomed on the left. Residual signals from a mannose present in culture media were used as reference (marked with asterisks).

HH103, was also included in these studies, showing an intermediate autoaggregation capacity ($29.4 \pm 1.3\%$), which was significantly different (P value < 0.05) from those of the wild type and the $\Delta mucR1$ mutant strains. Thus, our results indicate that *mucR1* inactivation results in an increased autoaggregation capacity of HH103, which is in agreement with the results, reported by Rachwał et al. (2015), for a *RosR* mutant of *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. To elucidate whether this increase in autoaggregation depends only on a decrease in EPS or also in additional bacterial traits requires further investigation.

Inactivation of *S. fredii mucR1* does not affect lipopolysaccharide (LPS), K-antigen polysaccharide (KPS), and intracellular CG production but enhances secretion of external CG.

In rhizobia, several genes are involved in the production of more than one surface polysaccharide. For example, the *S. fredii rkp-3* region is involved in both KPS and LPS synthesis (Margaret et al. 2012). Because of this, we decided to investigate whether *mucR1*, *mucR2*, or both could affect the production of other surface polysaccharides in *S. fredii* HH103. For this purpose, both LPS- and KPS-enriched fractions of bacterial crude extracts from HH103 and its $\Delta mucR1$, *mucR1::lacZ* Δp -Gm^R, *mucR2::lacZ* Δp -Gm^R, and $\Delta mucR1$ *mucR2::lacZ* Δp -Gm^R derivatives were prepared and were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). As shown in Supplementary Fig. S5, the LPS and KPS electrophoretic profiles of all the mutants tested were undistinguishable from those of the parental strain HH103. These results are in contrast to those reported by Janczarek et al. (2010), who found that *rosR* inactivation affected LPS O-antigen composition in *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.

S. fredii HH103 $\Delta mucR1$ bacterial crude extracts were also analyzed by ¹H-NMR, which provides structural information about KPS and internal CG (Supplementary Fig. S6), showing

that inactivation of *mucR1* did not affect the production of these polysaccharides in *S. fredii* HH103.

On the other hand, the ¹H-NMR analysis of extracellular polysaccharides produced by HH103 $\Delta mucR1$ revealed that this strain, in addition to a decreased EPS production, showed higher amounts of extracellular CG than the parental strain HH103 (Fig. 4, signals shaded in gray). Complementation of the mutation led to wild-type levels of external CG. In order to elucidate whether this phenomenon was specifically due to *mucR1* inactivation or was a consequence of reduction of EPS production, supernatants of HH103 *exoA* were also analyzed by ¹H-NMR (Fig. 4). The *exoA* mutant of HH103 also exhibits enhanced production of external CG, suggesting that, in HH103 $\Delta mucR1$, this phenotype might be an indirect effect of the diminution of EPS synthesis.

MucR1 is an important regulator of symbiosis of *S. fredii* HH103 with *Glycine max* cv. Williams and *Lotus burtii*.

In previous investigations, the inactivation of *mucR* orthologs showed different effects on symbiosis depending on the host plants (Janczarek et al. 2009, 2010; Keller et al. 1995). A *mucR* mutant of *S. meliloti* was not affected in symbiosis with *Medicago* spp., whereas inactivation of the *R. leguminosarum* bv. *trifolii* *mucR* ortholog (*rosR*) led to a significant decrease in nodule number and nitrogen fixation with *Trifolium* plants. In this work, we decided to investigate the symbiotic effect of the mutation of HH103 in *mucR1* on symbiosis with two host legumes, *Glycine max* (the American variety Williams) and *Lotus burtii* (Margaret et al. 2011; Sandal et al. 2012). It is worthwhile to note that *S. fredii* HH103 infects these two host plants by different mechanisms, i.e., infection threads in soybean and crack-entry with *Lotus burtii* (A. Acosta-Jurado, D. N. Rodríguez-Navarro, Y. Kawaharada, J. Fernández Perea, A. Gil Serrano, H. Jin, Q. An, M. A. Rodríguez-Carvajal, S. U. Andersen, N. Sandal,

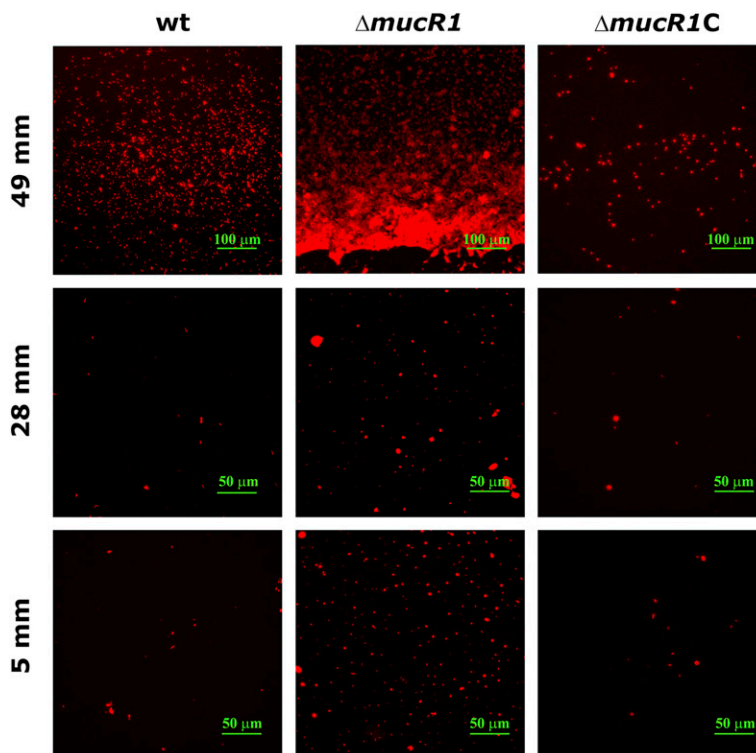


Fig. 3. Biofilm formation ability of *Sinorhizobium fredii* HH103 Rif^R (wt), its *mucR1* derivative ($\Delta mucR1$), and the complemented version of this mutant ($\Delta mucR1C$) harboring plasmid pSKDSRED on glass slides after 96 h of growth in MGM (O'Toole and Kolter 1998) medium. The amount of biofilm can be estimated as the fluorescence emitted by the attached bacterial population. Photos were taken at different heights of the glass slide (as indicated on the left), using Nikon Eclipse Ti-U epifluorescence microscopy with an excitation and emission wavelength of 554 and 586 nm, respectively.

J. Stougaard, J. M. Vinardell, and J. E. Ruiz-Sainz, unpublished; Margaret et al. 2011). Additionally, the *mucR2* and the double *mucR1 mucR2* mutants were also tested in soybean. Results presented in Tables 1 and 2 show that, in *S. fredii* HH103, inactivation of *mucR1* led to a severe impairment of symbiotic effectiveness with the two legumes tested. In fact, in both cases, plant shoot weights of plants inoculated with HH103 Δ *mucR1* were not different from those of noninoculated plants. On the other hand, inactivation of *mucR2* did not affect the symbiotic

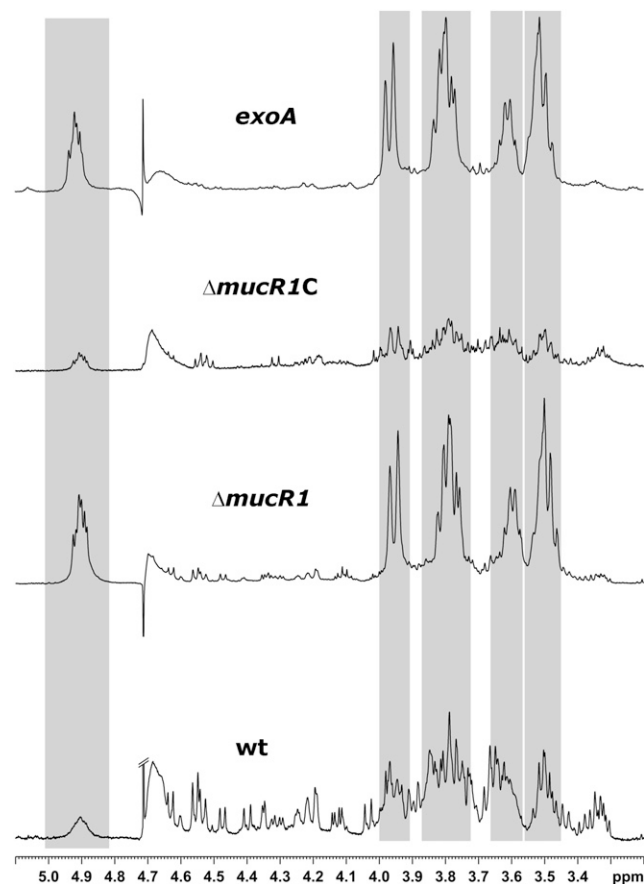


Fig. 4. Nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$) (500 MHz, 303 K) spectra of fractions containing cyclic glucans (CG) after isolation from *Sinorhizobium fredii* HH103 Rif^R (marked as wt), HH103 Δ *mucR1*, HH103 Δ *mucR1C*, and an *exoA* derivative of HH103. Signals from CG are shaded in gray.

Table 1. Responses of *Glycine max* cv. Williams to inoculation with *Sinorhizobium fredii* HH103 and its *mucR1* and *mucR2* derivatives^a

Inoculant ^b	Nodule number	Nodule fresh weight (mg)	Plant shoot dry weight (g) ^c
HH103 Rif ^R	58.4 ± 10.6	834.6 ± 208.6	2.55 ± 0.74
HH103 Δ <i>mucR1</i>	126.2 ± 49.0*	766.6 ± 268.0	1.20 ± 0.42*
HH103 Δ <i>mucR1C</i>	52.6 ± 12.2	792.6 ± 147.1	2.74 ± 0.78
HH103 <i>mucR2::lacZ-Gm^R</i>	60.4 ± 6.7	829.2 ± 168.7	2.33 ± 0.97
HH103 Δ <i>mucR1 mucR2::lacZ-Gm^R</i>	118.8 ± 21.6*	749.2 ± 39.9	1.54 ± 0.41*

^a Data represent averages of five Leonard jars, each one containing two soybean plants. Determinations were made 42 days after inoculation. All the treatments were individually compared with the values of the parental strain, using the nonparametric test of Mann-Whitney. The presence of an asterisk denotes a significant difference with a *P* value < 0.05.

^b Bacteria isolated from 12 nodules formed by each inoculant showed the expected resistance markers.

^c Plant shoot dry weight of noninoculated plants was 1.24 ± 0.21 g per jar.

performance of *S. fredii* HH103 with soybean ‘Williams’. The double *mucR1 mucR2* mutant exhibited the same phenotype as the Δ *mucR1* mutant. The complemented derivative of HH103 Δ *mucR1* was undistinguishable from the parental strain HH103 in the different parameters tested in their interaction with both soybean and *L. burtii*.

Strikingly, the nodule numbers induced by the Δ *mucR1* mutant were significantly higher with soybean but significantly lower with *L. burtii*, if compared with the nodule numbers induced by the parental strain. Acetylene reduction assays revealed that, in the case of soybean nodules, nitrogenase activity of the Δ *mucR1* derivative was ten-fold reduced with respect to that of the parental strain (309.8 ± 20.2 and 3,424.7 ± 971.2 nmoles ethylene per plant per hour, respectively). In *L. burtii*, the reduction of nitrogenase activity due to *mucR1* inactivation was less pronounced (95.0 ± 27.7 versus 295.6 ± 80.8).

During the preparation of this manuscript, an article describing the symbiotic role of the *S. fredii* CCBAU45436 *mucR1* and *mucR2* genes in their interaction with the Asiatic variety of *Glycine max* JD17 was published (Jiao et al. 2016). Jiao et al. (2016) found that inactivation of *mucR1* led to increased nodulation with this soybean variety but, also, to a dramatic impairment in nitrogen-fixation activity. The *mucR2* derivative of CCBAU45436 was not affected in its interaction with soybean JD17. Thus, our results are in agreement with those reported by Jiao et al. (2016), showing that, in *S. fredii* strains, *mucR1* but not *mucR2* is essential in the interaction with both Asiatic (as JD17) or commercially improved American (as ‘Williams’) varieties of soybean. In addition, our work shows that *mucR1* is also essential for HH103 symbiosis with another legume, *L. burtii*. However, in this legume, the symbiotic defect (a decrease in both nodule number and nitrogen fixation) appears to be different from that of the interaction of *S. fredii* with soybean and similar to that described for the *rosR* mutant of *R. leguminosarum* bv. *trifolii* with *Trifolium* spp. (Janczarek et al. 2010).

S. fredii HH103 MucR1 represses its transcription by binding to its own promoter.

Previous results have demonstrated that *S. meliloti mucR* and *R. leguminosarum* bv. *trifolii rosR* are negatively autoregulated (Janczarek and Skorupska 2007; Keller et al. 1995). In this work, we studied whether *S. fredii* HH103 MucR1 has an effect on its own transcription. A 408-bp fragment containing the upstream sequence of the *mucR1* gene as well as its start codon was fused to the *egfp* gene (coding for an enhanced version of the green fluorescent protein) present in plasmid pPHU231 (discussed below), which allows *mucR1* expression to be analyzed by measurement of fluorescence. The resultant plasmid, called pMUS1196, was introduced in both *S. fredii* HH103 Rif^R and its Δ *mucR1* derivative. In the *mucR1* mutant background, GFP expression (the ratio of fluorescence to optical density at

Table 2. Responses of *Lotus burtii* to inoculation with *Sinorhizobium fredii* HH103 and its *mucR1* derivative^a

Inoculant ^b	Nodule number	Plant shoot fresh weight (mg) ^c
HH103 Rif ^R	78.5 ± 20.6	1180.8 ± 386.8
HH103 Δ <i>mucR1</i>	42.4 ± 12.9*	235.2 ± 36.2*
HH103 Δ <i>mucR1C</i>	70.0 ± 14.8	973.1 ± 379.5

^a Data represent averages of at least four jars containing four plants each. Determinations were made 56 days after inoculation. All the treatments were individually compared with the values of the parental strain, using the nonparametric test of Mann-Whitney. The presence of an asterisk denotes a significant difference with a *P* value < 0.05.

^b Bacteria isolated from 12 nodules formed by each inoculant showed the expected resistance markers.

^c Plant shoot fresh-weight of noninoculated plants was 82.6 ± 27.1 mg per jar.

600 nm [OD₆₀₀]) driven by the *mucR1* promoter was 3.5-fold higher (363.19 ± 22.01) than that measured in the wild-type strain (100.00 ± 4.39), which suggests that MucR1 acts as a negative autoregulator.

In order to check whether HH103 MucR is able to bind to its own promoter, this protein was fused to GST (glutathione S-transferase), was overexpressed in *Escherichia coli*, was purified, and was used for EMSA (electrophoretic mobility shift assay) studies. As shown in Supplementary Figure S7, *S. fredii* HH103 MucR1 binds to a 399-bp DNA fragment that covers the upstream sequence (from -405 to -7) of *S. fredii mucR1*. When different internal fragments of this sequence were used in EMSA assays, binding of MucR1 was detected to fragments 2 (302 bp, between -405 and -104, with respect to the start codon) and 3 (271 bp, from -277 to -7), which overlap in 174 nucleotides. Fragment 3 contains a well-conserved MucR-binding (from -50 to -33) site, as defined for the *S. meliloti mucR* promoter (Bertram-Drogatz et al. 1997), but this site is not located in the sequence common to fragment 2. In fact, *S. fredii* MucR1 does not bind to fragment 4 (111 bp, from -117 to -7), which contains this putative MucR-binding site. Sequence analysis of the 174-bp sequence common to fragments 2 and 3 showed that it does not contain any well-conserved MucR- or RosR-binding site. Thus, we have detected binding of MucR1 to its own promoter sequence but, surprisingly, this binding appears not to be dependent on a well-conserved MucR binding site or, maybe, in addition to this site, an unidentified sequence is absolutely required for MucR binding. Similar results were found in *S. meliloti*, in which Bertram-Drogatz et al. (1998) found that MucR bound to upstream sequences of *exoH* and *exoY* but failed to find the consensus sequence previously defined for the *mucR* promoter (Bertram-Drogatz et al. 1997).

Altogether, our results show that, as expected, *S. fredii* HH103 MucR1 is a transcriptional regulator that represses its own expression.

S. fredii HH103 MucR1 is a global regulator.

Several studies documented the role of RosR/MucR in regulating different bacterial traits related to interaction with eukaryotic hosts not only in rhizobia but, also, in pathogenic

bacteria such as *Brucella abortus* and *B. melitensis* (Caswell et al. 2013; Janczarek 2011; Janczarek et al. 2010; Mirabella et al. 2013). We have also found that *S. fredii* HH103 MucR1 affects EPS and external GC production, pellicle formation, autoaggregation, and symbiotic performance with the two host plants tested, soybean and *L. burtii*. This prompted us to analyze, by transcriptomics, the set of genes whose expression is affected by MucR1 in *S. fredii* HH103. Since the number of nodules induced is significantly affected in the two host plants tested, we decided to perform the analysis in the presence or absence of genistein, an effective *nod*-inducer flavonoid for HH103 (Vinardell et al. 2004b).

Very recently, transcriptomic studies of the effect of the absence of MucR/RosR in *R. leguminosarum* bv. *trifolii* Rt24.2 and *S. fredii* CCBAU45436 (Jiao et al. 2016; Rachwał et al. 2015) have been published. In the former strain, 1,106 genes were differentially expressed in free-living cells of the wild-type strain and its *rosR* derivative (\log_2 of mutant/wild type values > 2). In *S. fredii* CCBAU45436, the numbers of differentially expressed genes (DEG) in the *mucR1* mutant when compared with the wild-type strain (\log_2 of mutant/wild type values > 1) were 621 and 597 in free-living cells and in bacteroids isolated from soybean nodules, respectively. The numbers of DEG in HH103 Δ *mucR1* (defined as genes showing a |fold-change| ≥ 3.5 or \log_2 of mutant/wild type values > 1.871) were 393 and 904 in the absence and in the presence of genistein, respectively, 265 of them being shared by both conditions (Supplementary Fig. S8; Supplementary Dataset 1). The expression levels of 20 DEG were validated by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) (Table 3). Thus, as previously reported for other rhizobia, HH103 MucR1 appears to be a global regulator affecting the expression of hundreds of genes. Detailed information about global gene expression levels in the wild type and the Δ *mucR1* strains in the absence or presence of genistein as well as the lists of DEG in both conditions are given in Supplementary Datasets 2 to 5.

S. fredii HH103 MucR1-dependent genes in the absence of genistein.

In the absence of genistein, 227 and 166 genes were up- and down-regulated, respectively, in HH103 Δ *mucR1*, as compared

Table 3. RNA-Seq data validation using quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)^a

Locus tag/promoter sequences	Gene name	Absence of genistein		Presence of genistein	
		RNA-Seq	qPCR	RNA-Seq	qPCR
psfHH103d_118	<i>nodA</i>	4.89	5.13 \pm 0.07	1.18	-1.29 \pm 0.42
psfHH103d_126/NB8		-1.35	-1.23 \pm 0.5	-3.60	-1.88 \pm 0.28
psfHH103d_208/NB17		9.31	4.38 \pm 0.01	-1.51	-1.26 \pm 0.17
psfHH103d_257/NB15		4.54	3.27 \pm 0.17	-2.05	1.11 \pm 0.21
psfHH103d_373/NB1	<i>mucR2</i>	9.25	11.64 \pm 5.58	-1.52	-1.17 \pm 0.01
psfHH103d_391		3.46	8.68 \pm 4.05	2.16	2.54 \pm 0.14
psfHH103d_448/NB13		7.11	4.54 \pm 0.44	-1.31	1.47 \pm 0.16
psfHH103d_604		-11.25	-5.56 \pm 2.16	-14.04	-9.48 \pm 7.59
SFHH103_00308	<i>fliG</i>	8.04	10.26 \pm 5.69	13.75	4.41 \pm 1.25
SFHH103_00335	<i>rem</i>	5.16	18.02 \pm 1.74	10.33	4.29 \pm 0.06
SFHH103_00387	<i>fbpA</i>	-70.28	-111.75 \pm 26.23	-38.44	-18.51 \pm 1.54
SFHH103_01240	<i>exoR</i>	-4.56	-3.28 \pm 1.45	-4.59	-3.92 \pm 0.08
SFHH103_02000	<i>ftsZ1</i>	4.80	4.98 \pm 0.33	1.67	2.60 \pm 0.18
SFHH103_02172	<i>ptsN</i>	9.89	40.62 \pm 9.17	6.18	17.57 \pm 1.52
SFHH103_02569		51.34	45.0 \pm 17.24	25.69	70.65 \pm 7.32
SFHH103_03584		106.74	124.51 \pm 1.29	28.68	503.2 \pm 41.76
SFHH103_05376	<i>exoA</i>	-2.0	-2.53 \pm 1.19	-4.09	-2.46 \pm 0.19
SFHH103_05378	<i>exoK</i>	-2.82	-3.03 \pm 0.46	-4.13	-2.60 \pm 0.1
SFHH103_05384	<i>exoY2</i>	-11.91	-4.35 \pm 0.38	-8.78	-3.90 \pm 0.97
SFHH103_06390		35.51	23.95 \pm 5.25	14.13	11.89 \pm 0.5

^a The expression of 20 individual genes was measured in *Sinorhizobium fredii* HH103 and in a Δ *mucR1* derivative, both in the presence or absence of genistein. For qRT-PCR, fold change values were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method (Pfaffl et al. 2002) and were normalized to the reference 16S rRNA. Data represent expression level fold changes in HH103 Δ *mucR1* with respect to HH103.

with the wild-type strain. Many of the genes affected (174 of 393) code for hypothetical proteins, including the two genes showing the highest fold-changes (SFHH103_03584 and 06391, +106.7 and +98.2, respectively). In agreement with previous results described for a *rosR* mutant of *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, the expression of at least 20 transcriptional regulators belonging to different families (such as GntR and LuxR) was altered (either induced or repressed) in the *mucR1* background compared with the wild-type strain, indicating that part of the DEG detected might not be directly controlled by MucR1. Among these regulatory elements, it is worthwhile to notice the presence of a Crp/FixK-like transcriptional regulator (psfHH103d_604, fold-change -11.3), which is involved in regulation of a large number of genes for the anoxic and microoxic, endosymbiotic, and nitrogen-fixing life styles of *Bradyrhizobium japonicum* (Mesa et al. 2008). Other interesting transcriptional regulators found as DEG are members of two-component systems such as the chemotaxis-related genes *cheY1* and *cheY2* or *feuP* (discussed below). Also interesting is the fact that two of the genes showing the highest levels of downregulation in HH103 Δ *mucR1* were *hmuS* (coding for a hemin transport/degrading protein, fold change -13.5) and *fbpA* (iron deficiency-induced periplasmic protein, -70.3), suggesting a role for MucR1 in regulation of Fe uptake.

Genes related to the synthesis of surface polysaccharides. Concerning genes related to the synthesis of surface polysaccharides, unexpectedly, most *exo* genes were not included as DEG, because they were little or not at all affected. This is the case for genes coding for glycosyl transferases putatively involved in the synthesis of the EPS structural subunit, such as *exoA*, *exoL*, *exoM*, or *exoO* (fold-changes of -2, -2.1, -1.2, and 1.6, respectively) or *exoN* and *exoB*, responsible for the production of UDP-Glc and UDP-Gal, respectively (-2.8 and -1.9). Similar results have been recently reported for a *RosR* mutant of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* Rt24 (Rachwał et al. 2015). Instead, the *exoY2* and *exoF1* genes, which are responsible for the addition of the first sugar residue (UDP-Gal) to the lipid carrier located in the internal membrane, and *exoQ*, whose encoded product is involved in EPS polymerization, were more strongly repressed (-11.9, -5, and -4.1 respectively). Most probably, these three genes constitute an operon (Rodríguez-Navarro et al. 2014). Our results are also in agreement with previous observations carried out in *S. meliloti* MucR, which has also a slight effect on *exo* gene expression but increases the transcription of *exoY*, *exoF*, and *exoQ* (Keller et al. 1995). Surprisingly, the HH103 *exoR* gene, which codes for a repressor of *exo* genes, is also repressed (-4.5) in the Δ *mucR1* background.

Other surface component-related genes that are down-regulated in the *mucR1* mutant background are *lpxC*, coding for a UDP-3-*O*-acyl-*N*-acetylglucosamine deacetylase involved in lipid A biosynthesis, *ndvA*, involved in CG transport from the cytoplasm to the periplasm, and SFHH103_01577, which codes for a CG-modification protein containing the MdoB domain characteristic of phosphoglycerol transferases (fold-changes of -3.9, -5, and -6.2, respectively). Although we have not detected differences between the LPS electrophoretic patterns of HH103 and its Δ *mucR1* derivative, the possibility that the absence of MucR1 could provoke changes in the LPS non-detected by PAGE analyses cannot be discarded. Regarding CG, supernatants of *S. fredii* HH103 Δ *mucR1* exhibited higher amounts of extracellular CG than those of the parental strain. To our knowledge, there is no information available about how CG are secreted to the medium, since *ndvA* is an internal membrane protein involved in the transport of CG from the cytoplasm to the periplasm. On the other hand, at least in *S. meliloti*, external CG appears to be predominantly neutral (Geiger et al. 1991). The fact that both *ndvA* and SFHH103_01577 (which codes for a putative CG phosphoglycerol transferase) are

repressed in HH103 Δ *mucR1* could be related to this enhanced secretion of CG to the medium. We have also demonstrated that a HH103 mutant unable to produce EPS exhibits enhanced CG secretion, suggesting that this phenomenon could be a consequence of depletion in EPS production. However, elucidation of the relationship between EPS and external CG production in *S. fredii* HH103 requires further investigation. Remarkably, in HH103 Δ *mucR1*, the response regulator-encoding gene *feuP* is down-regulated (-5.4). In *S. meliloti*, this gene controls the transcription of at least 16 genes (including *ndvA*) in response to low osmolarity conditions (Griffitts et al. 2008). In addition to *ndvA*, orthologs of seven other genes (all coding for hypothetical proteins) induced by *FeuP* in *S. meliloti* are also clearly down-regulated in the HH103 Δ *mucR1* background, i.e., SFHH103_00611 (-5.8, ortholog of SMB20838), SFHH103_00710 (-4.7, SMc00065), SFHH103_00740 (-5.2, SMc02389), SFHH103_01338 (-8.4, SMc00252), SFHH103_01771 (-5.8, SMc04336), SFHH103_02119 (-5.2, SMc01557), and SFHH103_02145 (-11.0, SMc01586).

Genes involved in motility and chemotaxis. Regarding genes showing upregulation in HH103 Δ *mucR1* in the absence of genistein, it is worth mentioning the presence of a large set of genes related to chemotaxis and motility. This is in clear contrast to the results recently reported by Rachwał and coworkers (2015) for *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, in which it was found that *RosR* positively regulates these genes and, in consequence, bacterial motility but in agreement with the fact that *S. meliloti* MucR represses bacterial motility (Bahlawane et al. 2008). The group of upregulated chemotaxis-related proteins in HH103 Δ *mucR1* includes the two-component response regulator receiver proteins *CheY1* and *CheY2* (fold-changes of +11.1 and +7.3), the chemotaxis signal transduction protein *CheW1* (+9.5), the methyltransferase *CheR* (+6.3), and the putative antisigma regulatory factor *CheX* (+5.4). Regarding motility-related genes, different *fli*, *flg*, *fla* (including *flaC*), and *mot* genes involved in motor activity, flagellum-dependent cell motility process, and regulation or flagellum filament components were up-regulated in the *mucR1* derivative. These results prompted us to investigate whether swimming or surface motility could be affected by *mucR1* inactivation, as described below. Surprisingly, neither swimming (13.1 ± 0.6 mm in HH103 Δ *mucR1* versus 13.5 ± 0.7 mm in HH103 after 72 h of incubation) nor surface motility (14.0 ± 7.2 mm versus 12.5 ± 4.0 mm after 72 h of incubation) were significantly affected in the HH103 *mucR1* derivative under our experimental conditions, indicating that the biological significance of the upregulation in this strain of such a high number of genes related to motility requires further investigation.

Genes belonging to the nod regulon. Interestingly, many genes located on the symbiotic plasmid and whose expression is dependent on NodD1 and genistein, since they are driven by *nod* boxes (NB) (Vinardell et al. 2015; Pérez-Montañón et al. 2016), are also up-regulated (fold-change >3.5) in HH103 Δ *mucR1* in the absence of flavonoids (Table 4), i.e., psfHH103d_373, _372 (NB1, putatively involved in hopanoid synthesis, fold-changes +9.2 and +8.5), psfHH103d_118, _116 (NB9, hypothetical proteins, +4.9 and +3.5), psfHH103d_448, _447 (NB13, hypothetical proteins, +7.1 and +4.0), psfHH103d_229, _228, _225 (NB14, hypothetical proteins putatively involved in electron transfer to nitrogenase, +8.1 to +4.5), psfHH103d_257 (NB15, histidinolphosphate aminotransferase involved in indole acetic acid production, +4.8), and psfHH103d_208 (NB17, hypothetical ABC-type transporter, +9.3). In addition, two genes whose expression is dependent on *ttb* boxes are also up-regulated in the Δ *mucR1* background in the absence of genistein, namely, a component of the symbiotic T3SS (psfHH103d_335, TB8, NopX, +4.0) and one of the effectors secreted through this apparatus (psfHH103d_349, TB11, NopP, +3.9). Since the role

of most of these proteins remains to be elucidated, it is difficult to understand the biological significance of their regulation by MucR1. However, it has been reported that inactivation of HH103 *nopP* improved symbiotic performance with soybean (López-Baena et al. 2009), which suggests that overexpression of this gene might affect this interaction negatively.

The presence of genistein increases the number of DEG in HH103 ΔmucR1. In the presence of genistein, the number of DEG found in HH103 *ΔmucR1* was 904, which is 2.3-fold higher than that detected in the absence of this flavonoid. The fact that the numbers of up- and down-regulated genes were 615 and 289, respectively, indicates that MucR1 acts mainly as a repressor. A total of 265 genes were differentially expressed in the *ΔmucR1* mutant both in the presence or absence of genistein. Supplementary Dataset 6 contains the list of these genes as well as their expression fold changes in HH103 *ΔmucR1* in both conditions (absence or presence of genistein). For all 265 genes, the sign (positive or negative) of their differential expression was the same in both conditions.

Genes related to surface polysaccharide production, motility, and chemotaxis. In the presence of genistein, genes related to EPS, periplasmic anionic CG production, flagella formation, or chemotaxis were also affected, which suggests that the regulatory effect of MucR1 in these bacterial traits is not dependent on the presence of flavonoids. Although there are additional *exo* genes

(*exoA*, *exoL*, *exoK*, *exoU*, *exoB*, fold changes varying between –3.6 and –4.3) that appear as downregulated in the *mucR1* mutant in the presence of genistein, these genes are also slightly repressed in the absence of genistein (ranging between –2 and –2.8). Regarding genes related to motility, it is worthwhile to note that the *flgA* gene (coding for a putative periplasmic chaperone that assists in the formation of the flagellar P ring) is 111.0 overexpressed in the *mucR1* mutant, as compared with the wild-type strain, in the presence of genistein, in contrast to a 2.8-fold induction in the absence of flavonoids. However, this difference could be an overestimation due to the fact that transcription of this gene was very low in the wild-type strain in the absence of genistein but not detected at all in the presence of the flavonoid. Other motility-related genes that were more highly expressed in the *mucR1* mutant in the presence of flavonoid were *fliL* (flagellar transmembrane protein, +7.3 versus +2.3) and the flagellar motor protein-coding genes *motB* (+17.2 versus +2.9) and *motC* (+15.2 versus +3.1). Remarkably, in the presence of genistein, these three genes are repressed in the wild-type strain (fold changes –2.9, –2.6, and –2.0, respectively), suggesting a complex regulation of motility-related genes in *S. fredii* HH103. We plan to study further the effect of flavonoids and the role of *mucR1* in HH103 motility and chemotaxis abilities in the near future.

Genes belonging to the nod regulon. Most of the NB-depending genes that were found overexpressed in the *ΔmucR1* mutant in the

Table 4. Effect of *mucR1* inactivation on the expression of the *nod* regulon in the absence or presence of genistein

NB ^a	Locus-tag (gene name)	Description	Fold change ^b	
			Without genistein	With genistein
NB1	psfHH103d_373	Hypothetical protein (putative steroid Delta-isomerase)	+9.2	–1.5
	psfHH103d_372	Squalene/phytoene synthase	+8.5	–1.2
	psfHH103d_371_5 (<i>hpnD</i>)	Putative squalene/phytoene synthase	+2.6	+1.3
	psfHH103d_371	Flavoprotein oxidoreductase	+2.2	+1.7
	psfHH103d_370 (<i>shc</i>)	Squalene-hopene cyclase	+1.8	+1.3
NB2	psfHH103d_381 (<i>nodZ</i>)	Nod factor fucosyl transferase	–3.0	–3.3
	psfHH103d_380 (<i>noeL</i>)	GDP-D-mannose dehydratase (involved in the synthesis of GDP-L-fucose for Nod factor decoration)	+1.1	–1.5
	psfHH103d_379 (<i>noIK</i>)	NAD-dependent nucleotide sugar epimerase/dehydrogenase (involved in the synthesis of GDP-L-fucose for Nod factor decoration)	+1.6	+1.1
NB3	psfHH103d_384	Hypothetical protein	+3.0	+1.3
NB8	psfHH103d_126 (<i>nodA</i>)	Nod factor acyl-transferase	–1.3	–3.6
	psfHH103d_127 (<i>nodB</i>)	Nod factor deacetylase	–1.1	–2.5
	psfHH103d_128 (<i>nodC</i>)	Nod factor backbone synthetase	–1.2	–1.4
	psfHH103d_129 (<i>nodI</i>)	Nod factor export ATP-binding protein	+1.2	+1.0
	psfHH103d_130 (<i>nodJ</i>)	Nod factor ABC-transporter permease	+1.0	+1.0
	psfHH103d_131 (<i>noIO</i>)	Nod factor carbamoyl transferase (truncated)	+1.6	+1.3
	psfHH103d_132 (<i>noel</i>)	Nod factor fucose methylase	+1.6	+1.5
	psfHH103d_118	Conserved hypothetical protein	+4.9	+1.2
NB9	psfHH103d_116	Hypothetical protein (putative dehydrogenase)	+3.5	+1.4
	psfHH103d_161 (<i>psiB</i>)	Conserved hypothetical protein (polysaccharide inhibition?)	+3.1	–1.7
NB10	psfHH103d_448	Hypothetical protein containing a REC domain	+7.1	–1.3
NB13	psfHH103d_408	Conserved hypothetical protein	+4.0	+1.6
	psfHH103d_447	Putative iron-sulfur cluster assembly accessory protein	+8.1	–1.4
NB14	psfHH103d_229	Hypothetical protein	+6.1	–1.4
	psfHH103d_227 (<i>fixA</i>)	Electron transfer flavoprotein beta subunit	+2.2	–1.6
	psfHH103d_226 (<i>fixB</i>)	Electron transfer flavoprotein alpha subunit	+2.4	–1.9
	psfHH103d_225 (<i>fixC</i>)	Oxidoreductase	+4.5	–1.2
	psfHH103d_224 (<i>fixX</i>)	Ferredoxin-like protein	+3.1	–1.2
	psfHH103d_257 (<i>y4wE</i>)	Indole Acetic Acid (IAA) biosynthesis	+4.8	–2.1
	psfHH103d_208	Hypothetical protein (ABC-type transport)	+9.3	–1.5
	psfHH103d_323 (<i>tttI</i>)	Transcriptional activator of the T3SS	+2.1	–1.9
NB15	psfHH103d_324 (<i>rhcC2</i>)	Component of the T3SS apparatus	+1.5	+1.3
	psfHH103d_325	Conserved putative lipoprotein	+1.5	+2.7
	psfHH103d_326	Transposase	–1.3	–1.2
	psfHH103d_367 (<i>syrM</i>)	Transcriptional regulator of symbiotic genes	+2.2	–1.4
	psfHH103d_368	Hypothetical protein containing an HTH domain	–1.3	–2.3
NB17	psfHH103d_369	Hypothetical protein (putative ACC deaminase, partial)	+1.0	–1.9

^a NB = *nod* box, according to Vinardell et al. (2015).

^b Fold induction of *mucR1* mutant versus wild type.

absence of flavonoids are not included in the list of DEG in the presence of genistein, indicating that when NodD1 is activated with flavonoids, the repressor effect of MucR1 on these genes is less pronounced (Table 4). Curiously, in the presence of genistein, the *nodA* gene is repressed in the Δ *mucR1* mutant (fold change -3.6), maybe because the expression of *nodD1* is also slightly reduced (-1.5). In order to further analyze this result, plasmid pMP240, which harbors a copy of the promoterless *lacZ* gene fused to the *Rhizobium leguminosarum nodA* promoter (de Maagd et al. 1988), was introduced in HH103 and its Δ *mucR1* derivative. In the presence of genistein, β -galactosidase activity (Miller units) of HH103 Δ *mucR1* (pMP240) was significantly lower than that of HH103 (pMP240) ($7,298 \pm 3,306$ versus $23,345 \pm 3,977$), confirming that the absence of MucR1 has a negative impact on *nodA* expression in *S. fredii* HH103. This positive effect of MucR1 on *nodD* and, therefore, *nodABC* expression has been previously described in *S. meliloti* (Mueller and González 2011). Remarkably, *nodZ*, which is also involved in Nod factor synthesis, is down-regulated (fold change -3.3) in the Δ *mucR1* background in the presence of genistein (Table 4). Taken together, our results suggest that MucR1 is another important regulator in symbiosis, modulating positively or negatively the expression of different genes belonging to the *nod* regulon. This fact might be related with the phenotype, a clear reduction in symbiotic effectiveness, exhibited by HH103 Δ *mucR1* with the two host legumes analyzed in this work.

In order to better understand the connection between MucR1 and the HH103 *nod* regulon, we looked for MucR- or RosR-binding boxes in the upstream sequences of all the HH103 *nod* box-driven genes. This search, which was carried out by using the *fuzznunc* utility from the EMBOSS software package (Rice et al. 2000), gave no results.

Genes related to inorganic ions transport. As mentioned before, Jiao and coworkers (2016) have very recently described the symbiotic phenotype of a *mucR1* derivative of *S. fredii* CCBAU45436 with soybean JD17. As we have found for HH103 Δ *mucR1* with soybean ‘Williams’, CCBAU45436 *mucR1* induces the formation of a higher number of nodules than the wild-type strain and these nodules exhibit a severe impairment in nitrogen-fixation capacity. In that work, the authors found that the expression of several ion transporters is down-regulated in bacteroids of a *mucR1* mutant. This might account for the reduction of nitrogen-fixation capacity of this mutant in soybean JD17 nodules. In our study, none of the transporter-encoding genes studied by Jiao et al. (2016) was induced by flavonoids in the wild-type strain and only a few of them were affected in the *mucR1* mutant. In the absence of genistein, *ssuAC* and *tauB* (involved in aliphatic and aminoethane sulphonate transport) were overexpressed (fold changes of $+7.3$, $+4$, and $+3.5$) in the *mucR1* derivative. In the presence of genistein, *modA* and *modC* (related to molybdenum transport) were, strikingly, repressed (-4.8) and induced ($+4.7$), respectively, in HH103 Δ *mucR1*, whereas *phoC* (phosphate transport) was induced ($+4.3$). Thus, our results indicate that the downregulation of different ion transporters caused by the lack of MucR1 observed in strain CCBAU45436 in the bacteroid state does not take place in free-living cells, even in the presence of inducing flavonoids.

Conclusions and perspectives.

The rhizobia-legume symbiosis involves a complex molecular dialogue that has to be finely regulated. On the bacterial part, recent studies reveal that the number of genes symbiotically related is higher than expected (Huyghe et al. 2015; Jiao et al. 2016; Lang et al. 2008; Pérez-Montañó et al. 2016) and that their regulation involves the participation of a number of transcriptional regulators. In addition to NodD, TtsI, and SyrM, global regulators such as NodR and MucR also play a role in

this process. *S. fredii* strains, in contrast to *S. meliloti* or *R. leguminosarum*, harbor two copies of the zinc-finger transcriptional regulator MucR, although only MucR1 appears to be functional in strains CCBAU45436 and HH103, due to a frameshift mutation in the 3' end of *mucR2* (Jiao et al. 2016). In this work, we have demonstrated that *S. fredii* HH103 MucR1 is a global regulator that affects the transcription of hundreds of genes, including those related to EPS production and CG export, and, in addition, is clearly connected to the *nod* regulon. In consequence, inactivation of *mucR1* not only affects free-living cells but, also, has negative consequences on symbiotic interaction. Remarkably, the HH103 MucR1 regulator affects differently symbiosis depending on the host plant. Thus, when this protein is absent, the interaction with *L. burtii* is negatively affected in both nodule number and nitrogen fixation, whereas, with ‘Williams’, soybean nodule number is increased, although nitrogen fixation is dramatically decreased, indicating that MucR1 is essential for *S. fredii* interactions with both American and Asiatic soybeans (Jiao et al. 2016). Our results suggest that MucR1 could either affect different steps of symbiosis in different hosts, affect the same step, such as nodule formation, or both in a different way in different plant species. In addition, the transcriptome analysis carried out in different rhizobia indicates that the same protein (MucR and RosR) can regulate similar sets of genes but in opposite ways in different species, as is the case for motility genes (repressed in *Sinorhizobium* spp., induced in *R. leguminosarum* bv. *trifolii*). Clearly, further research is required to elucidate the different processes controlled by MucR/RosR in rhizobia and how these regulators are integrated into the highly complex rhizobial symbiotic signaling.

MATERIALS AND METHODS

Basic molecular and microbiological techniques.

Sinorhizobium fredii strains were grown at 28°C on tryptone yeast (TY) medium (Beringer 1974), YM medium (Vincent 1970), MGM medium (O'Toole and Kolter 1998), or Bromfield medium (Sourjik and Schmitt 1996). *Escherichia coli* was cultured on Luria-Bertani (LB) medium (Sambrook and Russell 2001) at 37°C. When required, the media were supplemented with the appropriate antibiotics as described by Vinardell et al. (2004a). Genistein was dissolved in ethanol at a concentration of 1 mg/ml and was used at 1 μ g/ml. Plasmids were transferred from *E. coli* to rhizobia by triparental mating, using plasmid pRK2013 as a helper, as described by Simon (1984). β -galactosidase assays were performed as described by Vinardell et al. (2004a).

Recombinant DNA techniques were performed according to the general protocols of Sambrook and Russell (2001). For hybridization, DNA was blotted to Amersham Hybond-N nylon membranes and the DigDNA method of Roche was employed according to manufacturer's instructions. PCR amplifications were performed as previously described (Vinardell et al. 2004b). All primer pairs used in this work are listed in Supplementary Table S1.

Motility assays.

Swimming was examined on plates prepared with Bromfield medium containing 0.3% Bacto agar and inoculated with 3- μ l aliquots of rhizobial cultures grown in TY ($OD_{600} = 1$). Surface motility was analyzed on semisolid minimal medium plates with glycerol as carbon source, containing 0.4% agarose and 22 μ M ferric chloride after sterilization. Plates were supplemented with genistein for surface motility and were inoculated with 2 μ l of washed 10-fold concentrated cultures grown in TY broth to the late exponential phase. The migration zone was determined as the colony diameter (mm) after 24, 48, and 72 h (for swimming and surface motility on semisolid minimal medium) of incubation.

Autoaggregation, biofilm assays, and EPS production.

Bacterial autoaggregation assays were performed as previously described by Sorroche et al. (2012), with some modifications. The bacteria were grown in 4 ml of MGM medium supplemented with appropriate antibiotics, were incubated for 24 h at 28°C, were diluted 1:100 in MGM, and were incubated for 96 h under the same conditions. The bacterial suspensions (5 ml) were then transferred into a glass tube and were allowed to settle for 24 h at 4°C. A 0.2-ml aliquot of the upper portion of the suspension was transferred onto a microtiter plate, and the final OD₆₀₀ (OD_{final}) was measured. A control tube was vortexed for 30 s, and the initial OD₆₀₀ (OD_{initial}) was determined. The autoaggregation percentage was calculated as follows: $100 - [1 - (OD_{final}/OD_{initial})]$. The values of each treatment were compared with those of *S. fredii* HH103, using the Mann-Whitney nonparametrical test.

Assays for biofilm formation on plastic surfaces were carried out as described by Margaret et al. (2013). Data presented are the mean of at least three independent experiments performed in duplicate; in each experiment, at least 12 wells for each treatment were measured. In order to visualize biofilm formation on glass surfaces, *S. fredii* strains harboring plasmid pSKDSRED (Kelly et al. 2013) were cultured in MGM medium (28°C, static conditions) in sterile glass Coplin staining jars containing glass slides, as described by Rodríguez-Navarro et al. (2014). At 1 and 4 days after inoculation, glass slides were collected and air dried, were rinsed with NaCl 0.9%, were air dried, and were observed and photographed, using Nikon Eclipse Ti-U epifluorescence microscopy with an excitation and emission wavelength of 554 and 586 nm, respectively. Three different sections of the glass slide were examined (from the bottom to the upper part of the slide): 5, 28, and 49 mm, the latter corresponding to the liquid-air interface.

For analysis of EPS production in solid media, 20-μl droplets of YMB-grown early log (OD₆₀₀ = 0.4) cultures were placed onto YMA plates (supplemented or not with genistein), were incubated at 28°C for 96 h, and were photographed. For EPS quantification, bacterial cultures were grown on YM for 96 h at 28°C (OD₆₀₀ = 1.2 to 1.3) under shaking conditions. Cells were removed by centrifugation (20,000 × g, 15 min) and total carbohydrate amounts of the EPS-containing supernatants were determined, using the anthrone-H₂SO₄ method, which measures the total reducing sugar content in a given sample, as previously described (Abarca-Grau et al. 2012). Four independent experiments, in duplicate, were carried out. The amounts of EPS produced by each strain were compared with that of the parental strain by the Mann-Whitney nonparametric test.

Isolation of EPS and extracellular CG and analysis by NMR.

Culture supernatant (1 liter) was concentrated to 20% of its original volume on a rotary evaporator and was then mixed with ethanol (3 vol). The resulting precipitate contained the EPS, which was removed, by centrifugation, resuspended, and purified by dialysis. Supernatant was concentrated to 5% of their original volume, and 10 ml of it was mixed with ethanol (10 vol) to precipitate the low-molecular weight fraction that contained CG (Gil Serrano et al. 1993). The resulting precipitate was redissolved in water and was dialyzed with a 10-kDa JumboSep device (Pall Corporation). The diffusate was concentrated on a rotary evaporator and salts were removed by size-exclusion chromatography on BioGel P-2 (85 by 2 cm) with water as eluent. Fractions containing carbohydrates were detected using a refractive-index detector and the orcinol-sulfuric acid method on thin-layer chromatography plates and were then analyzed by NMR. Samples (1 to 5 mg) were deuterium-exchanged several times by freeze-drying from D₂O and were then examined in

solution (1 to 5 mg to 750 ml of 99.90% D₂O). Spectra were recorded on a Bruker AV500 spectrometer operating at 500.13 MHz (¹H). Chemical shifts are given in ppm, using the HDO signal (4.22 ppm at 353 K and 4.71 at 303 K) as a reference (Gottlieb et al. 1997).

Analysis of LPS and KPS.

LPS extraction from bacterial cultures grown on solid TY medium, separation on sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE gels and silver staining or immuno-staining with the monoclonal antibody NB6-228.22 were as described by Buendía-Clavería et al. (2003). KPS were extracted from bacterial cultures grown on solid TY medium and were analyzed by PAGE as described by Hidalgo et al. (2010). The detection of *S. fredii* KPS and CG by ¹H-NMR was performed as previously described (Crespo-Rivas et al. 2009; Hidalgo et al. 2010).

Nodulation assays.

Nodulation assays on *Glycine max* (L.) Merr. cv. Williams and *Lotus burttii* were carried out, as previously described by Crespo-Rivas et al. (2007) and Sandal et al. (2012), in a plant-growth chamber, with a 16-h photoperiod at 25°C in the light and 18°C in the dark. For soybean, each plant was inoculated with approximately 10⁸ bacteria and, then, was grown for at least 6 weeks. Plant tops were dried at 70°C for 48 h and were weighed. In the case of *Lotus* plants, four germinated seeds were transferred to each Leonard jar assembly and were inoculated with 10⁸ bacteria. Inoculated *Lotus* plants were grown for 6 to 9 weeks. Bacterial isolation from surface-sterilized nodules was carried out as previously described by Buendía-Clavería et al. (2003). Nitrogenase activity of nodules was assessed by ARA (acetylene reduction assay), as described by Buendía-Clavería and associates (1989). For the different parameters analyzed, the values of each treatment were compared with those of *S. fredii* HH103, using the Mann-Whitney nonparametrical test.

eGFP fluorescence assays.

For measuring transcription of *S. fredii* HH103 *mucR1*, its promoter region plus the first codon was PCR-amplified and digested with *Xba*I and *Hind*III and was fused, in frame, to the gene coding for eGFP, contained in plasmid pPHU231 (McIntosh et al. 2008), resulting in plasmid pMUS1196. For eGFP fluorescence assays, the method described by McIntosh et al. (2008) was used, with modifications. Transconjugants of *S. fredii* HH103 Rir^R and its Δ *mucR1* derivative containing plasmid pMUS1196 were first cultivated in YM broth at 28°C, with agitation, until medium exponential phase (OD₆₀₀ = 0.5 to 0.6), were diluted to OD₆₀₀ = 0.04, and 100-μl aliquots were inoculated into microtiter plate wells. The cell density (OD₆₀₀) and eGFP fluorescence (excitation at 485 nm and emission at 528 nm with a 35% scanning rate) were measured using a Tecan Infinite M200 reader (Tecan Trading AG). Data presented (eGFP fluorescence/OD₆₀₀) are the medians of two independent experiments performed in duplicate; in each duplicate, at least six wells for each treatment were measured. The eGFP fluorescence emitted for the corresponding strains carrying the empty vector pPHU231 was subtracted in all cases. The values obtained for HH103 pMUS1196 and HH103 Δ *mucR1* pMUS1196 were compared, using the Mann-Whitney nonparametrical test.

EMSA assays.

Expression and purification of the fusion proteins. The HH103 *mucR1* gene was PCR-amplified, using the attB1*mucR1* and attB2*mucR1* primers, which contain the sequences necessary for Gateway cloning. The amplified DNA fragment was subcloned into plasmid pDONR221, generating the pMUS1203 plasmid. Then, the *mucR1* gene was subcloned into the pGEX-KG

Gateway destination vector, to give pGEX-KG*mucR1*. Vector pGEX-KG added an in frame GST tag to the N-terminus of *mucR1*. Plasmid pGEX-KG*mucR1* was transferred to *E. coli* BL21, following the methodology described by Chung et al. (1989). Expression of the fusion protein was performed, following the general protocols described by Sambrook and Russell (2001). Briefly, *E. coli* BL21 carrying plasmid pGEX-KG*mucR1* was inoculated in 5 ml of LB and was grown overnight at 37°C. Cultures were transferred to 100 ml of LB supplemented with ampicillin and were incubated with shaking at 37°C until late exponential phase (OD₆₀₀ = 0.8) and, then, were induced with 1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside for at least 4 h and were centrifuged at approximately 2,000 × g for 20 min at 4°C. The supernatants were discarded and the pellets were stored at -80°C until use. Proteins were extracted and purified using a glutathione sepharose 4B resin, following the protocol described by Smith and Johnson (1988), and the purified proteins were quantified using a Nanodrop apparatus (Thermo Fisher Scientific).

Proteins were separated by SDS-PAGE, using the discontinuous buffer system of Laemmli (1970). Electrophoresis was performed on SDS 12% (m/v) polyacrylamide gels, and proteins were visualized using PageBlue (Thermo Fisher Scientific), following the manufacturer's instructions. For immunostaining, proteins were separated and electroblotted to Immobilon-P nitrocellulose membranes (Bio-Rad), using a Mini Trans-Blot electrophoretic transfer cell (Bio-Rad). Membranes were blocked with Tris-buffered saline containing 2% (m/v) bovine serum albumin (BSA) and were incubated with antibodies raised against GST (Cell Signaling) diluted 1:1,000 in the same solution. Antirabbit immunoglobulin antibodies (AP-conjugate) were used as secondary antibodies. Reaction results were visualized using nitroblue tetrazolium-5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate.

EMSA analysis. Cy5-labeled DNA fragments 1 to 5 were amplified by PCR, using different primers in such a way that all the fragments were labeled with Cy5. Each labeled DNA fragment in a concentration of 50 ng was mixed with purified MucR1-GST at different concentrations (0, 0.5, and 5 μg) in a reaction buffer containing 50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 100 mM NaCl, 0.1 mM Mg₂SO₄, 4.5% glycerol, and BSA at 0.5 mg/ml, to give a final volume of 25 μl. After 30 min of incubation at 20°C, the mixture was loaded into a 1.5% nondenaturing agarose gel prepared in Tris-glycine, pH 8.3, and prerun for 40 to 60 min in the same buffer at 4°C. The electrophoresis was carried out at 90 V for 2 h at 4°C in Tris-glycine, pH 8.3. Gel images were acquired, using a Typhoon 3000 variable mode imager (Amersham Bioscience).

qRT-PCR.

Results obtained in the RNA-Seq analysis were validated by qRT-PCR of 20 selected genes, which represented DEG and non-DEG in the two strains in the absence and presence of genistein. Total RNA was isolated using the High Pure RNA isolation kit (Roche) and RNase free DNA set (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. This (DNA free) RNA was reverse transcribed to cDNA by using PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (Takara). qPCR was performed using a LightCycler 480 (Roche, Switzerland) with the following conditions: 95°C, 10 min; 95°C, 30 s; 50°C, 30 s; 72°C, 20 s; 40 cycles, followed by the melting curve profile from 60 to 95°C, to verify the specificity of the reaction. The *S. fredii* HH103 16S rRNA was used as an internal control to normalize gene expression. The fold changes of two biological samples with three technical replicates in each condition were obtained using the ΔΔC_t method (Pfaffl et al. 2002).

RNA-Seq.

The RNA-Seq data discussed in this publication have been deposited in the Sequence Read Archive of the National Center

for Biotechnology Information (BioProject database) under the BioProjects ID PRJNA313151 and PRJNA324263. All samples showed more than 90% of proper pair reads. Three different RNA-Seq metrics for quality control, GC content, duplicate distribution, and the distribution of respective genetic coordinates were performed. A normalization of the quantification data was also carried out before all subsequent analysis to avoid statistical deviations due to differences in library and genetic sizes (Hansen et al. 2012).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Biology, Microscopy, NMR, and Mass Spectrometry Services of the Centro de Investigación, Tecnología e Innovación (CITIUS) of the University of Seville. We also acknowledge J.-C. Treviño (Sistemas Genómicos S.L., Spain) for his valuable help during all the bioinformatics analyses, and J. Trow (Sequence Read Archive from the National Center for Biotechnology Information) for his technical assistance during the RNA-Seq data submission. We also thank D.-N. Rodríguez-Navarro for providing *Lotus burtii* seeds. This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (BIO2011-30229 and AGL2012-38831) and the Andalusia Government (P07-CVI-07500). S. A. Jurado and P. Navarro-Gomez are recipients of Ph.D. grants from the V Plan Propio de Investigación of the University of Seville.

LITERATURE CITED

- Abarca-Grau, A. M., Burbank, L. P., de Paz, H. D., Crespo-Rivas, J. C., Marco-Noales, E., López, M. M., Vinardell, J. M., von Bodman, S. B., and Penyalver, R. 2012. Role for *Rhizobium rhizogenes* K84 cell envelope polysaccharides in surface interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:1644-1651.
- Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., Murdoch, P. S., Crespo-Rivas, J. C., Jie, S., Cuesta-Berrio, L., Ruiz-Sainz, J. E., Rodríguez-Carvajal, M. A., and Vinardell, J. M. 2016. Exopolysaccharide production by *Sinorhizobium fredii* HH103 is repressed by genistein in a NodD1-dependent manner. *PLoS One* 11:e0160499.
- Bahlawane, C., McIntosh, M., Krol, E., and Becker, A. 2008. *Sinorhizobium meliloti* regulator MucR couples exopolysaccharide synthesis and motility. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21:1498-1509.
- Beringer, J. E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 84:188-198.
- Bertram-Drogatz, P. A., Quenter, I., Becker, A., and Pühler, A. 1998. The *Sinorhizobium meliloti* MucR protein, which is essential for the production of high-molecular-weight succinoglycan exopolysaccharide, binds to short DNA regions upstream of *exoH* and *exoY*. *Mol. Gen. Genet.* 257:433-441.
- Bertram-Drogatz, P. A., Rüberg, S., Becker, A., and Pühler, A. 1997. The regulatory protein MucR binds to a short DNA region located upstream of the *mucR* coding region in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 254:529-538.
- Buendía-Clavería, A. M., Chamber, M., and Ruiz-Sainz, J. E. 1989. A comparative study of the physiological characteristics, plasmid content and symbiotic properties of different *Rhizobium fredii* strains. *Syst. Appl. Microbiol.* 12:203-209.
- Buendía-Clavería, A. M., Moussaid, A., Ollero, F. J., Vinardell, J. M., Torres, A., Moreno, J., Gil Serrano, A. M., Rodríguez-Carvajal, M. A., Tejero-Mateo, P., Peart, J. L., Brewin, N. J., and Ruiz-Sainz, J. E. 2003. A *purL* mutant of *Sinorhizobium fredii* HH103 is symbiotically defective and altered in its lipopolysaccharide. *Microbiology* 149:1807-1818.
- Caswell, C. C., Elhassanny, A. E., Planchin, E. E., Roux, C. M., Weeks-Gorosse, J. N., Ficht, T. A., Dunman, P. M., and Roop, R. M., 2nd. 2013. Diverse genetic regulon of the virulence-associated transcriptional regulator MucR in *Brucella abortus* 2308. *Infect. Immun.* 81:1040-1051.
- Chen, H., Gao, K., Kondorosi, E., Kondorosi, A., and Rolfe, B. G. 2005. Functional genomic analysis of global regulator NodR in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:1340-1352.
- Chou, A. Y., Archdeacon, J., and Kado, C. I. 1998. *Agrobacterium* transcriptional regulator Ros is a prokaryotic zinc finger protein that regulates the plant oncogene *ipt*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:5293-5298.
- Chung, C. T., Niemela, S. L., and Miller, R. H. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:2172-2175.
- Crespo-Rivas, J. C., Margaret, I., Hidalgo, A., Buendía-Clavería, A. M., Ollero, F. J., López-Baena, F. J., del Socorro Murdoch, P., Rodríguez-Carvajal, M. A., Soria-Díaz, M. E., Reguera, M., Lloret, J., Sumpton, D. P., Mosely, J. A., Thomas-Oates, J. E., van Brussel, A. A. N., Gil

- Serrano, A., Vinardell, J. M., and Ruiz-Sainz, J. E. 2009. *Sinorhizobium fredii* HH103 *cgs* mutants are unable to nodulate determinate- and indeterminate nodule-forming legumes and overproduce an altered EPS. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22:575-588.
- Crespo-Rivas, J. C., Margaret, I., Pérez-Montaña, F., López-Baena, F. J., Vinardell, J. M., Ollero, F. J., Moreno, J., Ruiz-Sainz, J. E., and Buendía-Clavería, A. M. 2007. A *pyrF* auxotrophic mutant of *Sinorhizobium fredii* HH103 impaired in its symbiotic interactions with soybean and other legumes. *Int. Microbiol.* 10:169-176.
- de Maagd, R. A., Wijffelman, C. A., Pees, E., and Lugtenberg, B. J. 1988. Detection and subcellular localization of two Sym plasmid-dependent proteins of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *J. Bacteriol.* 170: 4424-4427.
- Dong, H., Liu, W., Peng, X., Jing, Z., and Wu, Q. 2013. The effects of MucR on expression of type IV secretion system, quorum sensing system and stress responses in *Brucella melitensis*. *Vet. Microbiol.* 166:535-542.
- Downie, J. A. 2010. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol. Rev.* 34:150-170.
- Fumeaux, C., Radhakrishnan, S. K., Ardisson, S., Théraulaz, L., Frandi, A., Martins, D., Nesper, J., Abel, S., Jenal, U., and Viollier, P. H. 2014. Cell cycle transition from S-phase to G1 in *Caulobacter* is mediated by ancestral virulence regulators. *Nat. Commun.* 5:4081.
- Geiger, O., Weissborn, A. C., and Kennedy, E. P. 1991. Biosynthesis and excretion of cyclic glucans by *Rhizobium meliloti* 1021. *J. Bacteriol.* 173:3021-3024.
- Gil Serrano, A. M., Franco-Rodríguez, G., Gonzalez-Jiménez, I., Tejero Mateo, P., Molina, J. M., Dobado, J. A., Megias, M., and Romero, M. J. 1993. The structure and molecular mechanics calculations of the cyclic (1-2)- β -D-glucan secreted by *Rhizobium tropici* CIAT 899. *J. Mol. Struct.* 301:211-226.
- Gottlieb, H. E., Kotlyar, V., and Nudelman, A. 1997. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *J. Org. Chem.* 62: 7512-7515.
- Griffiths, J. S., Carlyon, R. E., Erickson, J. H., Moulton, J. L., Barnett, M. J., Toman, C. J., and Long, S. R. 2008. A *Sinorhizobium meliloti* osmosensory two-component system required for cyclic glucan export and symbiosis. *Mol. Microbiol.* 69:479-490.
- Hansen, K. D., Irizarry, R. A., and Wu, Z. 2012. Removing technical variability in RNA-seq data using conditional quantile normalization. *Biostatistics* 13:204-216.
- Hidalgo, A., Margaret, I., Crespo-Rivas, J. C., Parada, M., Murdoch, P. S., López, A., Buendía-Clavería, A. M., Moreno, J., Albareda, M., Gil Serrano, A. M., Rodríguez-Carvajal, M. A., Palacios, J. M., Ruiz-Sainz, J. E., and Vinardell, J. M. 2010. The *rkpU* gene of *Sinorhizobium fredii* HH103 is required for bacterial K-antigen polysaccharide production and for efficient nodulation with soybean but not with cowpea. *Microbiology* 156:3398-3411.
- Huyghe, A., Bakkou, N., and Perret, X. 2015. Profiling symbiotic responses of *Sinorhizobium fredii* strain NGR234 with RNA-seq. Pages 1153-1162 in: *Biological Nitrogen Fixation*. F. J. de Bruijn, ed. Vol. 2. John Wiley & Sons, New York.
- Janczarek, M. 2011. Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 7898-7933.
- Janczarek, M., Jaroszuk-Scisiel, J., and Skorupska, A. 2009. Multiple copies of *rosR* and *pssA* genes enhance exopolysaccharide production, symbiotic competitiveness and clover nodulation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Antonie van Leeuwenhoek* 96:471-486.
- Janczarek, M., Kutkowska, J., Piersiak, T., and Skorupska, A. 2010. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosR* is required for interaction with clover, biofilm formation and adaptation to the environment. *BMC Microbiol.* 10:284.
- Janczarek, M., Rachwał, K., Marzec, A., Grządziel, J., and Palusińska-Szys, M. 2015. Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume-rhizobium interactions. *Appl. Soil Ecol.* 85:94-113.
- Janczarek, M., and Skorupska, A. 2007. The *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *RosR*: Transcriptional regulator involved in exopolysaccharide production. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:867-881.
- Janczarek, M., and Skorupska, A. 2011. Modulation of *rosR* expression and exopolysaccharide production in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* by phosphate and clover root exudates. *Int. J. Mol. Sci.* 12:4132-4155.
- Jiao, J., Wu, L. J., Zhang, B., Hu, Y., Li, Y., Zhang, X. X., Guo, H. J., Liu, L. X., Chen, W. X., Zhang, Z., and Tian, C. F. 2016. MucR is required for transcriptional activation of conserved ion transporters to support nitrogen fixation of *Sinorhizobium fredii* in soybean nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 29:352-361.
- Keller, M., Roxlau, A., Weng, W. M., Schmidt, M., Quandt, J., Niehaus, K., Jording, D., Arnold, W., and Pühler, A. 1995. Molecular analysis of the *Rhizobium meliloti* *mucR* gene regulating the biosynthesis of the exopolysaccharides succinoglycan and galactoglucan. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:267-277.
- Kelly, S. J., Muszyński, A., Kawaharada, Y., Hubber, A. M., Sullivan, J. T., Sandal, N., Carlson, R. W., Stougaard, J., and Ronson, C. W. 2013. Conditional requirement for exopolysaccharide in the *Mesorhizobium-Lotus* symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26:319-329.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lang, K., Lindemann, A., Hauser, F., and Göttfert, M. 2008. The genistein stimulant of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Genet. Genomics* 279:203-211.
- López-Baena, F. J., Monreal, J. A., Pérez-Montaña, F., Guasch-Vidal, B., Bellogín, R. A., Vinardell, J. M., and Ollero, F. J. 2009. The absence of Nops secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103 increases GmPR1 expression in Williams soybean. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22: 1445-1454.
- López-Baena, F. J., Ruiz-Sainz, J. E., Rodríguez-Carvajal, M. A., and Vinardell, J. M. 2016. Bacterial molecular signals in the *Sinorhizobium fredii*-soybean symbiosis. *Int. J. Mol. Sci.* 17:755.
- Margaret, I., Becker, A., Blom, J., Bonilla, I., Goesmann, A., Göttfert, M., Lloret, J., Mittard-Runte, V., Rückert, C., Ruiz-Sainz, J. E., Vinardell, J. M., and Weidner, S. 2011. Symbiotic properties and first analyses of the genomic sequence of the fast growing model strain *Sinorhizobium fredii* HH103 nodulating soybean. *J. Biotechnol.* 155:11-19.
- Margaret, I., Crespo-Rivas, J. C., Acosta-Jurado, S., Buendía-Clavería, A. M., Cubo, M. T., Gil-Serrano, A., Moreno, J., Murdoch, P. S., Rodríguez-Carvajal, M. A., Rodríguez-Navarro, D. N., Ruiz-Sainz, J. E., Sanjuán, J., Soto, M. J., and Vinardell, J. M. 2012. *Sinorhizobium fredii* HH103 *rkp-3* genes are required for K-antigen polysaccharide structure and are essential for infection of legumes forming determinate nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25:825-838.
- Margaret, I., Lucas, M. M., Acosta-Jurado, S., Buendía-Clavería, A. M., Fedorova, E., Hidalgo, Á., Rodríguez-Carvajal, M. A., Rodríguez-Navarro, D. N., Ruiz-Sainz, J. E., and Vinardell, J. M. 2013. The *Sinorhizobium fredii* HH103 lipopolysaccharide is not only relevant at early soybean nodulation stages but also for symbiosome stability in mature nodules. *PLoS One* 8:e74717.
- McIntosh, M., Krol, E., and Becker, A. 2008. Competitive and cooperative effects in quorum-sensing-regulated galactoglucan biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 190:5308-5317.
- Mesa, S., Hauser, F., Friberg, M., Malaguti, E., Fischer, H. M., and Hennecke, H. 2008. Comprehensive assessment of the regulons controlled by the FixLJ-FixK₂-FixK₁ cascade in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 190:6568-6579.
- Mirabella, A., Terwagne, M., Zygmunt, M. S., Cloeckert, A., De Bolle, X., and Letesson, J. J. 2013. *Brucella melitensis* MucR, an orthologue of *Sinorhizobium meliloti* MucR, is involved in resistance to oxidative, detergent, and saline stresses and cell envelope modifications. *J. Bacteriol.* 195:453-465.
- Mueller, K., and González, J. E. 2011. Complex regulation of symbiotic functions is coordinated by MucR and quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 193:485-496.
- O'Toole, G. A., and Kolter, R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28:449-461.
- Oldroyd, G. E. 2013. Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.* 11:252-263.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., and Bedmar, E. J. 2015. Bacterial associations with legumes. *Crit. Rev. Plant Sci.* 34:17-42.
- Pérez-Montaña, F., Jiménez-Guerrero, I., Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., Ollero, F. J., Ruiz-Sainz, J. E., López-Baena, F. J., and Vinardell, J. M. 2016. A transcriptomic analysis of the effect of flavonoids on *Sinorhizobium fredii* HH103 reveals novel rhizobial genes putatively involved in symbiosis. *Scientific Reports* 6:31592.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., and Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30: e36.
- Rachwał, K., Matczyńska, E., and Janczarek, M. 2015. Transcriptome profiling of a *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosR* mutant reveals the role of the transcriptional regulator *rosR* in motility, synthesis of cell-surface components, and other cellular processes. *BMC Genomics* 16:1111.
- Rice, P., Longden, I., and Bleasby, A. 2000. EMBOSS: The European molecular biology open software suite. *Trends Genet.* 16:276-277.

- Rodríguez-Navarro, D. N., Rodríguez-Carvajal, M. A., Acosta-Jurado, S., Soto, M. J., Margaret, I., Crespo-Rivas, J. C., Sanjuán, J., Temprano, F., Gil Serrano, A., Ruiz-Sainz, J. E., and Vinardell, J. M. 2014. Structure and biological roles of *Sinorhizobium fredii* HH103 exopolysaccharide. *PLoS One* 9:e115391.
- Sambrook, J., and Russell, D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
- Sandal, N., Jin, H., Rodríguez-Navarro, D. N., Temprano, F., Cvitanich, C., Brachmann, A., Sato, S., Kawaguchi, M., Tabata, S., Parniske, M., Ruiz-Sainz, J. E., Andersen, S. U., and Stougaard, J. 2012. A set of *Lotus japonicus* Gifu \times *Lotus burtii* recombinant inbred lines facilitates map-based cloning and QTL mapping. *DNA Res.* 19:317-323.
- Simon, R. 1984. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vitro constructed Tn5-Mob transposon. *Mol. Gen. Genet.* 196:413-420.
- Smith, D. B., and Johnson, K. S. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione *S*-transferase. *Gene* 67:31-40.
- Sorroche, F. G., Spesia, M. B., Zorreguieta, A., and Giordano, W. 2012. A positive correlation between bacterial autoaggregation and biofilm formation in native *Sinorhizobium meliloti* isolates from Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:4092-4101.
- Sourjik, V., and Schmitt, R. 1996. Different roles of CheY1 and CheY2 in the chemotaxis of *Rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* 22:427-436.
- Suzaki, T., and Kawaguchi, M. 2014. Root nodulation: A developmental program involving cell fate conversion triggered by symbiotic bacterial infection. *Curr. Opin. Plant Biol.* 21:16-22.
- Vinardell, J. M., Acosta-Jurado, S., Zehner, S., Göttfert, M., Becker, A., Baena, I., Blom, J., Crespo-Rivas, J. C., Goesmann, A., Jaenicke, S., Krol, E., McIntosh, M., Margaret, I., Pérez-Montaña, F., Schneiker-Bekel, S., Serranía, J., Szczepanowski, R., Buendía, A. M., Lloret, J., Bonilla, I., Pühler, A., Ruiz-Sainz, J. E., and Weidner, S. 2015. The *Sinorhizobium fredii* HH103 genome: A comparative analysis with *S. fredii* strains differing in their symbiotic behavior with soybean. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 28:811-824.
- Vinardell, J. M., López-Baena, F. J., Hidalgo, A., Ollero, F. J., Bellogín, R., del Rosario Espuny, M., Temprano, F., Romero, F., Krishnan, H. B., Pueppke, S. G., and Ruiz-Sainz, J. E. 2004a. The effect of FITA mutations on the symbiotic properties of *Sinorhizobium fredii* varies in a chromosomal-background-dependent manner. *Arch. Microbiol.* 181: 144-154.
- Vinardell, J. M., Ollero, F. J., Hidalgo, A., López-Baena, F. J., Medina, C., Ivanov-Vangelov, K., Parada, M., Madinabeitia, N., Espuny, Mdel. R., Bellogín, R. A., Camacho, M., Rodríguez-Navarro, D. N., Soria-Díaz, M. E., Gil Serrano, A. M., and Ruiz-Sainz, J. E. 2004b. NodR regulates diverse symbiotic signals of *Sinorhizobium fredii* HH103. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:676-685.
- Vincent, J. M. 1970. The modified Fåhræus slide technique. Appendix III. Pages 144-145 in: *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. J. M. Vincent, ed. Blackwell Scientific, Oxford.
- Wang, Y., Hay, I. D., Rehman, Z. U., and Rehm, B. H. 2015. Membrane-anchored MucR mediates nitrate-dependent regulation of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99:7253-7265.
- Weidner, S., Becker, A., Bonilla, I., Jaenicke, S., Lloret, J., Margaret, I., Pühler, A., Ruiz-Sainz, J. E., Schneiker-Bekel, S., Szczepanowski, R., Vinardell, J. M., Zehner, S., and Göttfert, M. 2012. Genome sequence of the soybean symbiont *Sinorhizobium fredii* HH103. *J. Bacteriol.* 194: 1617-1618.

Anexo III. Publicaciones durante el periodo predoctoral

Margaret, I., Crespo-Rivas, J.C., Acosta-Jurado, S., Buendía-Clavería, A.M., Cubo, M.T., Gil-Serrano, A., Moreno, J., Murdoch, P.S., Rodríguez-Carvajal, M.A., Rodríguez-Navarro, D.N., Ruiz-Sainz, J.E., Sanjuán, J., Soto, M.J., Vinardell, J.M. 2012. *Sinorhizobium fredii* HH103 *rkp-3* genes are required for K-antigen polysaccharide biosynthesis, affect lipopolysaccharide structure and are essential for infection of legumes forming determinate nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25:825–838.

Margaret, I., Lucas, M., Acosta-Jurado, S., Buendía-Clavería, A.M., Fedorova, E., Hidalgo, A., Rodríguez-Carvajal, M.A., Rodríguez-Navarro, D.N., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M. 2013. The *Sinorhizobium fredii* HH103 lipopolysaccharide is not only relevant at early soybean nodulation stages but also for symbiosome stability in mature nodules. *PLoS ONE* 8:e74717.

Rodríguez-Navarro, D.N., Rodríguez-Carvajal, M.A., Acosta-Jurado, S., Soto, M.J., Margaret, I., Crespo-Rivas, J.C., Sanjuan, J., Temprano, F., Gil-Serrano, A., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M. 2014. Structure and biological roles of *Sinorhizobium fredii* HH103 exopolysaccharide. *PLoS ONE* 9: e115391.

Vinardell, J.M., Acosta-Jurado, S., Zehner, S., Gottfert, M., Becker, A., Baena, I., Blom, J., Crespo-Rivas, J.C., Goesmanns, A., Jaenickes, S., Krol, E., McIntosh, M., Margaret, I., Pérez-Montaña, F., Schneiker-Bekels, S., Serranias, J., Szczepanowski, R., Buendía, A.M., Lloret, J., Bonilla, I., Pühler, A., Ruiz-Sainz, J.E., Weidner, S. 2015. The *Sinorhizobium fredii* HH103 genome: a comparative analysis with *S. fredii* strains differing in their symbiotic behavior with soybean. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 28:811-824.

Crespo-Rivas, J., Guefrachi, I., Mok, K., Villaécija-Aguilar, J., Acosta-Jurado, S., Pierre, O., Ruiz-Sainz, J., Taga, M., Mergaert, P. Vinardell, J.M. 2015. *Sinorhizobium fredii* HH103 bacteroids are not terminally differentiated and show altered O-antigen in nodules of the Inverted Repeat-Lacking Clade legume *Glycyrrhiza uralensis*. *Environ. Microbiol.* 18:2392-2404.

Pérez-Montaña, F., Jiménez-Guerrero, I., Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., Ollero, F.J., Ruiz-Sainz, J.E., López-Baena, F.J., Vinardell, J.M. 2016. A transcriptomic analysis of the effect of genistein on *Sinorhizobium fredii* HH103 reveals novel rhizobial genes putatively involved in symbiosis. Sci. Rep. 6:31592.

***Sinorhizobium fredii* HH103 *rkp-3* Genes Are Required for K-Antigen Polysaccharide Biosynthesis, Affect Lipopolysaccharide Structure and Are Essential for Infection of Legumes Forming Determinate Nodules**

Isabel Margaret,¹ Juan C. Crespo-Rivas,¹ Sebastián Acosta-Jurado,¹ Ana M. Buendía-Clavería,¹ María T. Cubo,¹ Antonio Gil-Serrano,² Javier Moreno,³ Piedad S. Murdoch,⁴ Miguel A. Rodríguez-Carvajal,² Dulce N. Rodríguez-Navarro,⁵ José E. Ruiz-Sainz,¹ Juan Sanjuán,⁶ María J. Soto,⁶ and José M. Vinardell¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avda. Reina Mercedes 6, C.P. 41012, Sevilla, Spain; ²Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Apdo. 553, 41071-Sevilla, Spain; ³Departamento de Biología Celular y Bioquímica Vegetal and ⁴Departamento de Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla; ⁵IFAPA, Centro Las Torres-Tomejil. Apartado Oficial 41200, Alcalá del Río, Sevilla, Spain; ⁶Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Apartado 419, 18080 Granada, Spain

Submitted 3 October 2011. Accepted 26 February 2012.

The *Sinorhizobium fredii* HH103 *rkp-3* region has been isolated and sequenced. Based on the similarities between the *S. fredii* HH103 *rkpL*, *rkpM*, *rkpN*, *rkpO*, *rkpP*, and *rkpQ* genes and their corresponding orthologues in *Helicobacter pylori*, we propose a possible pathway for the biosynthesis of the *S. fredii* HH103 K-antigen polysaccharide (KPS) repeating unit. Three *rkp-3* genes (*rkpM*, *rkpP*, and *rkpQ*) involved in the biosynthesis of the HH103 KPS repeating unit (a derivative of the pseudaminic acid) have been mutated and analyzed. All the *rkp-3* mutants failed to produce KPS and their lipopolysaccharide (LPS) profiles were altered. These mutants showed reduced motility and auto-agglutinated when early-stationary cultures were further incubated under static conditions. *Glycine max*, *Vigna unguiculata* (determinate nodule-forming legumes), and *Cajanus cajan* (indeterminate nodules) plants inoculated with mutants in *rkpM*, *rkpQ*, or *rkpP* only formed pseudonodules that did not fix nitrogen and were devoid of bacteria. In contrast, another indeterminate nodule-forming legume, *Glycyrrhiza uralensis*, was still able to form some nitrogen-fixing nodules with the three *S. fredii* HH103 rifampicin-resistant *rkp-3* mutants tested. Our results suggest that the severe symbiotic impairment of the *S. fredii* *rkp-3* mutants with soybean, *V. unguiculata*, and *C. cajan* is mainly due to the LPS alterations rather than to the incapacity to produce KPS.

Rhizobia are soil bacteria able to establish symbiotic interactions with leguminous plants that lead to the formation of root nodules in which these bacteria fix atmospheric nitrogen. This *Rhizobium*-legume interaction involves a complex set of

molecular interactions that takes place during the development and maintenance of nitrogen-fixing nodules on the plant roots. Inside the nodules, rhizobia fix atmospheric nitrogen that becomes an assimilable source of nitrogen to the plant. This molecular dialogue between the bacteria and the plant begins when flavonoids, naturally exuded by the legume, activate the transcription of bacterial nodulation genes. Some of these genes (*nod*, *nol*, and *noe*) encode proteins responsible for the biosynthesis and secretion of signal molecules called “Nod factors” or lipochitin oligosaccharides, which mediate species specificity and induce the development of root nodules in the plant (Gage 2004; Jones et al. 2007).

In addition to Nod factors, different rhizobial surface polysaccharides are commonly necessary for successful nodulation. Exopolysaccharides (EPS), lipopolysaccharides (LPS), capsular polysaccharides (KPS [K-antigen polysaccharides]), and cyclic glucans (CG) are the main rhizobial polysaccharides investigated, because they might act as signal molecules or could prevent plant defense reactions (Breedveld and Miller 1998; Frayssé et al. 2003; Krol and Becker 2009; Mithöfer 2002). KPS and CG but not EPS appear to play important roles in the *S. fredii*–soybean symbiosis (Crespo-Rivas et al. 2009; Parada et al. 2006). The symbiotic properties of *S. fredii* mutants specifically affected in genes responsible for the biosynthesis of LPS have not been reported. In *Bradyrhizobium japonicum*, however, mutants showing deficiencies in structure of their LPS are symbiotically impaired (Puvanesarajah et al. 1987; Quelas et al. 2010).

S. fredii possesses an exceptionally broad host range (Pueppke and Broughton 1999), so that this rhizobial species is especially interesting for the study of the relevance of each bacterial surface polysaccharide in the symbiotic interaction with many different legumes, including both plants forming determinate or indeterminate nodules. In the *S. meliloti*–alfalfa symbiosis, which generates the formation of indeterminate nodules, KPS can substitute for EPS in the nodulation process (Reuhs et al. 1995). In contrast, KPS by itself appears to be relevant in the *S. fredii*–soybean symbiosis, which induces the formation of determinate nodules. In this symbi-

Amino acid and nucleotide sequence data is available in the EMBL database under accession numbers JN642175 and JN642176.

Corresponding author: J. E. Ruiz-Sainz. Telephone: +34-954557121; Fax: +34-954557830; E-mail: rsainz@us.es

*The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates that Figure 5 appears in color online.

The *Sinorhizobium fredii* HH103 Lipopolysaccharide Is Not Only Relevant at Early Soybean Nodulation Stages but Also for Symbiosome Stability in Mature Nodules

Isabel Margaret¹, M. Mercedes Lucas², Sebastián Acosta-Jurado¹, Ana M. Buendía-Clavería¹, Elena Fedorova^{2*}, Ángeles Hidalgo¹, Miguel A. Rodríguez-Carvajal³, Dulce N. Rodríguez-Navarro⁴, José E. Ruiz-Sainz¹, José M. Vinardell^{1*}

1 Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Sevilla, Spain, **2** Instituto de Ciencias Agrarias, CSIC, Madrid, Spain, **3** Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain, **4** IFAPA, Centro Las Torres-Tomejil, Alcalá del Río (Sevilla), Spain

Abstract

In this work we have characterised the *Sinorhizobium fredii* HH103 *greA* *lpsB* *lpsCDE* genetic region and analysed for the first time the symbiotic performance of *Sinorhizobium fredii* *lps* mutants on soybean. The organization of the *S. fredii* HH103 *greA*, *lpsB*, and *lpsCDE* genes was equal to that of *Sinorhizobium meliloti* 1021. *S. fredii* HH103 *greA*, *lpsB*, and *lpsE* mutant derivatives produced altered LPS profiles that were characteristic of the gene mutated. In addition, *S. fredii* HH103 *greA* mutants showed a reduction in bacterial mobility and an increase of auto-agglutination in liquid cultures. RT-PCR and qPCR experiments demonstrated that the HH103 *greA* gene has a positive effect on the transcription of *lpsB*. Soybean plants inoculated with HH103 *greA*, *lpsB* or *lpsE* mutants formed numerous ineffective pseudonodules and showed severe symptoms of nitrogen starvation. However, HH103 *greA* and *lps* mutants were also able to induce the formation of a reduced number of soybean nodules of normal external morphology, allowing the possibility of studying the importance of bacterial LPS in later stages of the *S. fredii* HH103-soybean symbiosis. The infected cells of these nodules showed signs of early termination of symbiosis and lytical clearance of bacteroids. These cells also had very thick walls and accumulation of phenolic-like compounds, pointing to induced defense reactions. Our results show the importance of bacterial LPS in later stages of the *S. fredii* HH103-soybean symbiosis and their role in preventing host cell defense reactions. *S. fredii* HH103 *lpsB* mutants also showed reduced nodulation with *Vigna unguiculata*, although the symbiotic impairment was less pronounced than in soybean.

Citation: Margaret I, Lucas MM, Acosta-Jurado S, Buendía-Clavería AM, Fedorova E, et al. (2013) The *Sinorhizobium fredii* HH103 Lipopolysaccharide Is Not Only Relevant at Early Soybean Nodulation Stages but Also for Symbiosome Stability in Mature Nodules. PLoS ONE 8(10): e74717. doi:10.1371/journal.pone.0074717

Editor: Biao Ding, The Ohio State University, United States of America

Received: May 28, 2013; **Accepted:** August 4, 2013; **Published:** October 1, 2013

Copyright: © 2013 Margaret et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Andalusia Government (P07-CVI-02506), the Spanish Ministry of Science and Innovation (BIO2011-30229-C02-01), and the Comunidad de Madrid (Programa Microambiente S2009/AMB-1511). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jvinar@us.es

† Current address: Department of Molecular Biology, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands

Introduction

The lipopolysaccharide (LPS) is a complex glycolipid component present in the outer leaflet of the Gram-negative bacteria, including rhizobia [1–3]. The LPS of rhizobia shows the same general architecture as that from LPS of enteric and animal Gram-negative pathogens. It can be conceptually divided into three different structural regions: an inner acylated saccharide known as lipid A that is linked to a central core oligosaccharide which is attached to an outer O-chain polysaccharide [4]. A single preparation of rhizobial LPS contains a mixture of LPS molecules. This mixture is usually composed of molecules that carry various lengths of the O-chain polysaccharide, core oligosaccharide, and lipid A, but also contains molecules which are devoid of the O-chain polysaccharide [2]. LPS molecules with O-chain polysaccharide are often referred to as “smooth” LPS (or S-LPS), and those without O-chain as rough LPS, or R-LPS. LPS molecules carrying truncated (shorter) O-chains (“semi-rough” or “semi-

smooth” LPS) can also be observed, particularly in some mutants [5].

LPS may play significant roles at different stages of the (*Brady*/*Sino*/*Meso*)*Rhizobium*-legume symbioses, such as initial recognition and infection, invasion of root cortical cells, bacterial penetration into plant cells, formation and persistence of functional symbiosomes and nodule senescence. LPS may act as inhibitors of plant defence responses, as bacterial signals, as a physical passive barrier, or as antigens mimicking a plant-like interface [2,6,7].

O-chain rhizobial mutants are defective in indeterminate-nodule forming legumes (such as *Pisum sativum* or *Medicago sativa*) in the endocytotic invasion of the root nodule cells [8–11]. The presence of an intact LPS is also necessary for the formation of effective determinate nodules. Thus, *Rhizobium etli*, *Bradyrhizobium japonicum*, and *B. elkanii* mutants that lacked the O-chain are defective in their symbioses with determinate-nodule forming legumes, such as *Phaseolus vulgaris* or *Glycine max*. In some cases, nodules are not formed while in others the small white nodules

RESEARCH ARTICLE

Structure and Biological Roles of *Sinorhizobium fredii* HH103 Exopolysaccharide

Dulce N. Rodríguez-Navarro^{1*}, Miguel A. Rodríguez-Carvajal^{2*}, Sebastián Acosta-Jurado³, María J. Soto⁴, Isabel Margaret³, Juan C. Crespo-Rivas³, Juan Sanjuan⁴, Francisco Temprano¹, Antonio Gil-Serrano², José E. Ruiz-Sainz³, José M. Vinardell^{3*}

1. IFAPA, Centro las Torres-Tomejil, Apartado Oficial 41200, Alcalá del Río, (Sevilla), Spain, 2. Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain, 3. Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain, 4. Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, Spain

*jvinar@us.es

These authors contributed equally to this work.



OPEN ACCESS

Citation: Rodríguez-Navarro DN, Rodríguez-Carvajal MA, Acosta-Jurado S, Soto MJ, Margaret I, et al. (2014) Structure and Biological Roles of *Sinorhizobium fredii* HH103 Exopolysaccharide. PLoS ONE 9(12): e115391. doi:10.1371/journal.pone.0115391

Editor: Ali Al-Ahmad, University Hospital of the Albert-Ludwigs-University Freiburg, Germany

Received: July 22, 2014

Accepted: November 21, 2014

Published: December 18, 2014

Copyright: © 2014 Rodríguez-Navarro et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by grants from the Andalusia Government (P07-CVI-02506) and the Spanish Ministry of Science and Innovation (BIO2010-18005, BIO2011-30229-C02-01, AGL2009-13487-C04-02). The authors also thank the European Regional Development Fund (FEDER) for financial support. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Here we report that the structure of the *Sinorhizobium fredii* HH103 exopolysaccharide (EPS) is composed of glucose, galactose, glucuronic acid, pyruvic acid, in the ratios 5:2:2:1 and is partially acetylated. A *S. fredii* HH103 *exoA* mutant (SVQ530), unable to produce EPS, not only forms nitrogen fixing nodules with soybean but also shows increased competitive capacity for nodule occupancy. Mutant SVQ530 is, however, less competitive to nodulate *Vigna unguiculata*. Biofilm formation was reduced in mutant SVQ530 but increased in an EPS overproducing mutant. Mutant SVQ530 was impaired in surface motility and showed higher osmosensitivity compared to its wild type strain in media containing 50 mM NaCl or 5% (w/v) sucrose. Neither *S. fredii* HH103 nor 41 other *S. fredii* strains were recognized by soybean lectin (SBL). *S. fredii* HH103 mutants affected in exopolysaccharides (EPS), lipopolysaccharides (LPS), cyclic glucans (CG) or capsular polysaccharides (KPS) were not significantly impaired in their soybean-root attachment capacity, suggesting that these surface polysaccharides might not be relevant in early attachment to soybean roots. These results also indicate that the molecular mechanisms involved in *S. fredii* attachment to soybean roots might be different to those operating in *Bradyrhizobium japonicum*.

The *Sinorhizobium fredii* HH103 Genome: A Comparative Analysis With *S. fredii* Strains Differing in Their Symbiotic Behavior With Soybean

José-María Vinardell,¹ Sebastián Acosta-Jurado,¹ Susanne Zehner,² Michael Göttfert,² Anke Becker,³ Irene Baena,⁴ Jochem Blom,⁵ Juan Carlos Crespo-Rivas,¹ Alexander Goesmann,⁵ Sebastian Jaenicke,⁵ Elizaveta Krol,³ Matthew McIntosh,³ Isabel Margaret,¹ Francisco Pérez-Montaño,¹ Susanne Schneiker-Bekel,⁵ Javier Serranía,³ Rafael Szczepanowski,⁵ Ana-María Buendía,¹ Javier Lloret,⁴ Ildefonso Bonilla,⁴ Alfred Pühler,⁵ José-Enrique Ruiz-Sainz,¹ and Stefan Weidner⁵

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Avda. Reina Mercedes 6, C.P. 41012 Sevilla, Spain; ²Technische Universität Dresden, Institut für Genetik, Helmholtzstrasse 10, 01062 Dresden, Germany; ³LOEWE Center for Synthetic Microbiology (SYNMIKRO) and Faculty of Biology, Philipps-Universität Marburg, Hans-Meerwein-Str. 6, 35043 Marburg, Germany; ⁴Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Darwin 2, 28049-Madrid, Spain; ⁵Centrum für Biotechnologie (CeBiTec), Universität Bielefeld, Universitätsstr. 27, 33615 Bielefeld, Germany

Submitted 18 December 2015. Accepted 30 January 2015.

Sinorhizobium fredii HH103 is a fast-growing rhizobial strain infecting a broad range of legumes including both American and Asiatic soybeans. In this work, we present the sequencing and annotation of the HH103 genome (7.25 Mb), consisting of one chromosome and six plasmids and representing the structurally most complex *sinorhizobial* genome sequenced so far. Comparative genomic analyses of *S. fredii* HH103 with strains USDA257 and NGR234 showed that the core genome of these three strains contains 4,212 genes (61.7% of the HH103 genes). Synteny plot analysis revealed that the much larger chromosome of USDA257 (6.48 Mb) is colinear to the HH103 (4.3 Mb) and NGR234 chromosomes (3.9 Mb). An additional region of the USDA257 chromosome of about 2 Mb displays similarity to plasmid pSfHH103e. Remarkable differences exist between HH103 and NGR234 concerning *nod* genes, flavonoid effect on surface polysaccharide production, and quorum-sensing systems. Furthermore a number of protein secretion systems have been found. Two genes coding for putative type III-secreted effectors not previously described in *S. fredii*, *nopI* and *gunA*, have been located on the HH103 genome. These differences could be important to understand the different symbiotic behavior of *S. fredii* strains HH103, USDA257, and NGR234 with soybean.

Rhizobia are α - and β -proteobacteria that are able to establish nitrogen-fixing symbioses with legumes. The enormous ecological and agricultural importance of legumes explains the extensive studies on the rhizobial-legume symbiosis carried out

during the last 40 years. The development of next generation sequencing technologies stimulated genomic studies of both symbiotic partners. The first rhizobial genomes sequenced and assembled were those of *Sinorhizobium meliloti* 1021 (Galibert et al. 2001) and *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (Kaneko et al. 2002), two strains that can be considered model symbionts. Since then, the number of available rhizobial genome sequences has notably increased (National Center for Biotechnology Information [NCBI] Microbial Genomes Resources database), although most of them are draft sequences or have not been manually annotated.

Sinorhizobium fredii is a rhizobial species that has an extremely broad host range (more than 100 genera of legumes are nodulated) that includes plants forming determinate nodules, such as *Glycine max*, as well as plants developing indeterminate nodules, such as *Glycyrrhiza uralensis* (Pueppke and Broughton 1999). Thus, studies on the diverse symbiotic signals produced by *S. fredii* strains are both interesting and complicated, since the relevance of each of these signals for symbiosis may vary with the host plant. Among the different *S. fredii* strains known, the three most studied so far are NGR234 (until recently known as *Rhizobium* sp.), USDA257, and HH103. In fact, genomic information is available for all of them. The sequence of the NGR234 genome was reported in 2009 by Schmeisser and colleagues, a draft of the USDA257 genome sequence has been announced recently by Schuldes et al. (2012), and we have already published our first studies on the HH103 genome (Margaret et al. 2011; Weidner et al. 2012).

There are differences between these three *S. fredii* strains regarding their nodulation host range, which makes them particularly interesting for comparative analyses. *S. fredii* NGR234 possesses the largest host range known so far. In a study carried out with 452 legumes (Pueppke and Broughton 1999), strain USDA257 nodulated an exact subset (79 genera) of the NGR234 hosts (112 genera). The HH103 host range has not been studied in such a detail, but it seems to be closer to that of USDA257 (Margaret et al. 2011). However, a few significant differences between these two strains exist. HH103 is able to induce Fix⁺ nodules on *Neonotonia wightii* and *Erythrina variegata* (de Lyra et al. 2006), plants that are not nodulated by

Nucleotide sequence data are available at the EMBL database under accession numbers HE616890 to HE616893, HE616899, CDSA010000001 to CDSA010000004, and LN735562.

Corresponding author: José M. Vinardell; Telephone: +34-954554330; Fax: +34-954557830; E-mail: jvinar@us.es

*The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates that four supplementary tables are published online.

Sinorhizobium fredii HH103 bacteroids are not terminally differentiated and show altered O-antigen in nodules of the Inverted Repeat-Lacking Clade legume *Glycyrrhiza uralensis*

Juan C. Crespo-Rivas,^{1*} Ibtissem Guefrachi,²
Kenny C. Mok,³ José A. Villaécija-Aguilar,^{1,2†}
Sebastián Acosta-Jurado,¹ Olivier Pierre,²
José E. Ruiz-Sainz,¹ Michiko E. Taga,³
Peter Mergaert² and José M. Vinardell¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avda. Reina Mercedes 6, CP 41012, Sevilla, Spain.

²Institute for Integrative Biology of the Cell, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 9198, 91198, Gif-sur-Yvette, France.

³Department of Plant and Microbial Biology, University of California, Berkeley, CA 94720, USA.

Summary

In rhizobial species that nodulate inverted repeat-lacking clade (IRLC) legumes, such as the interaction between *Sinorhizobium meliloti* and *Medicago*, bacteroid differentiation is driven by an endoreduplication event that is induced by host nodule-specific cysteine rich (NCR) antimicrobial peptides and requires the participation of the bacterial protein BacA. We have studied bacteroid differentiation of *Sinorhizobium fredii* HH103 in three host plants: *Glycine max*, *Cajanus cajan* and the IRLC legume *Glycyrrhiza uralensis*. Flow cytometry, microscopy analyses and viability studies of bacteroids as well as confocal microscopy studies carried out in nodules showed that *S. fredii* HH103 bacteroids, regardless of the host plant, had deoxyribonucleic acid (DNA) contents, cellular sizes and survival rates similar to those of free-living bacteria. Contrary to *S. meliloti*, *S. fredii* HH103 showed little or no sensitivity to *Medicago* NCR247 and NCR335 peptides. Inactivation of *S. fredii* HH103 *bacA* neither affected symbiosis with *Glycyrrhiza* nor increased bacterial sensitivity to *Medicago* NCRs. Finally, HH103 bacteroids isolated from *Glycyrrhiza*,

but not those isolated from *Cajanus* or *Glycine*, showed an altered lipopolysaccharide. Our studies indicate that, in contrast to the *S. meliloti*-*Medicago* model symbiosis, bacteroids in the *S. fredii* HH103-*Glycyrrhiza* symbiosis do not undergo NCR-induced and *bacA*-dependent terminal differentiation.

Introduction

Rhizobia are soil *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria* (Sawada *et al.*, 2003; Downie, 2010) able to establish symbiotic associations with leguminous plants. These symbioses lead to the formation of nodules, which are specialized organs on roots (or occasionally stems) of legumes in which bacteria reduce N₂ to ammonia (reviewed by Jones *et al.*, 2007; Sprent, 2007; Masson-Boivin *et al.*, 2009; Kondorosi *et al.*, 2013; Oldroyd, 2013). In return, the plant provides the carbon sources required for bacterial proliferation within the nodules and to fuel the nitrogenase activity of the nitrogen-fixing forms of rhizobia known as bacteroids. The formation of nitrogen fixing nodules requires rhizobia to infect root tissues and establish persistent colonies within the cytoplasm of nodule cells. Rhizobia invade the cytoplasmic space of the host cells via an endocytosis-like process releasing organelle-like structures called symbiosomes into the cytoplasm. Inside the symbiosome, bacteria undergo a series of transformations to differentiate into nitrogen-fixing bacteroids.

A traditional classification divides nodules into two different types, determinate and indeterminate (Crespi and Gálvez, 2000; Suzaki *et al.*, 2015). The former are typically from (sub)tropical legumes such as soybean, beans and cowpea, and are spherical in shape due to a temporary meristematic activity. Indeterminate nodules, which are typically from temperate legumes such as vetch, pea and clover, on the other hand have a long-lasting meristematic activity resulting in an elongated nodule shape. Earlier studies on bacteroid differentiation led to the general conclusion that in indeterminate nodules, but not in determinate ones, rhizobia undergo a terminal differentiation process involving endoreduplication and cell elongation (reviewed in Kondorosi *et al.*, 2013). However, later studies showed that several rhizobial strains do not

Received 1 June, 2015; accepted 20 October, 2015. *For correspondence. E-mail jrcrespo@us.es; Tel. +34-954557121; Fax +34-954557830. †Present address: Institute of Genetics, University of Munich (LMU), Martinsried, Germany.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

A transcriptomic analysis of the effect of genistein on *Sinorhizobium fredii* HH103 reveals novel rhizobial genes putatively involved in symbiosis

Received: 28 May 2016

Accepted: 19 July 2016

Published: 19 August 2016

F. Pérez-Montaño, I. Jiménez-Guerrero, S. Acosta-Jurado, P. Navarro-Gómez, F. J. Ollero, J. E. Ruiz-Sainz, F. J. López-Baena & J. M. Vinardell

Sinorhizobium fredii HH103 is a rhizobial soybean symbiont that exhibits an extremely broad host-range. Flavonoids exuded by legume roots induce the expression of rhizobial symbiotic genes and activate the bacterial protein NodD, which binds to regulatory DNA sequences called *nod* boxes (NB). NB drive the expression of genes involved in the production of molecular signals (Nod factors) as well as the transcription of *ttsI*, whose encoded product binds to *tts* boxes (TB), inducing the secretion of proteins (effectors) through the type 3 secretion system (T3SS). In this work, a *S. fredii* HH103 global gene expression analysis in the presence of the flavonoid genistein was carried out, revealing a complex regulatory network. Three groups of genes differentially expressed were identified: i) genes controlled by NB, ii) genes regulated by TB, and iii) genes not preceded by a NB or a TB. Interestingly, we have found differentially expressed genes not previously studied in rhizobia, being some of them not related to Nod factors or the T3SS. Future characterization of these putative symbiotic-related genes could shed light on the understanding of the complex molecular dialogue established between rhizobia and legumes.

The symbiotic relationship between legumes and nitrogen-fixing rhizobia involves reciprocal communication by means of chemical signals produced by the plant and the bacterium. Plant root secreted flavonoids are phenolic compounds that act as inducers of the bacterial *nod* genes, which encode enzymes for the production of specific lipochitooligosaccharidic signal molecules or Nod factors (NFs) that, in turn, are responsible for root infection and induction of nodule development. Within this new organ, differentiated bacteria reduce atmospheric nitrogen to ammonia, which is assimilated by the host plant in exchange of a carbon source and an appropriate environment that promotes bacterial growth^{1,2}.

The regulatory protein NodD is constitutively expressed and codes for a LysR-type transcriptional activator that, in the presence of specific flavonoids, recognizes and binds to *nod* boxes (NB), promoter sequences located upstream of nodulation genes, triggering their transcription^{3–5}. Interestingly, many other symbiotic-related traits such as polysaccharide production, phytohormone synthesis, motility, quorum sensing, and the activation of the type 3 secretion system (T3SS) are regulated, depending on the rhizobial strain, by specific inducer flavonoids and NodD^{1,6–11}. However, to our knowledge, only a few genome-wide transcriptomic analyses of the effect of flavonoids on rhizobial gene expression have been performed so far. In *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 about 100 genes were induced with genistein, including all *nod* box-associated genes, type 3 secreted effectors, the flagellar cluster, and several genes likely involved in transport processes¹². Recently Huyghe *et al.*¹³ reported that many *Sinorhizobium fredii* NGR234 genes responded to the presence of daidzein: a total of 754 genes with a cutoff [fold-change value] ≥ 2 . Although *nod* box- and T3SS-associated genes were those showing the highest levels of induction, these results are in agreement with those reported for *B. japonicum*, that indicate that flavonoids have a much broader function than the mere induction of the *nod* genes.

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Sevilla, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.M.V. (email: jvinar@us.es)